

Ismo Korhonen

DIGITAALINEN MIKROPEILILAITTE OPTI- SEN HAPPIANTURIN SOVELLUKSESSA

Diplomityö

Informaatioteknologian ja viestinnän tiedekunta

Tarkastajat: professori emeritus Jukka Leikkala ja DI Hannu Välimäki

helmikuu 2020

TIIVISTELMÄ

ISMO KORHONEN: Digitaalinen mikrobeililaite optisen happianturin sovelluksessa

Tampereen yliopisto

Diplomityö, 63 sivua

Helmikuu 2020

Sähkötekniikan diplomi-insinöörin tutkinto-ohjelma

Pääaine: Lääketieteellinen tekniikka

Tarkastajat: emeritusprofessori Jukka Lekkala ja DI Hannu Välimäki

Avainsanat: DMD, optinen hapen mittaust, happiherkkä fluorofori, *in vitro*

Tampereen yliopistolla on kehitetty tehokas, solukasvatusliuoksen happikonsentraatiota mittaava fluoresenssiin perustuva happianturi. Tässä työssä haluttiin kasvattaa kyseisen happianturin spatiaalista tarkkuutta. Tätä varten happianturiin lisättiin fluoresoivan aineen eksitaatiovalon kohdennus käyttäen digitaalista mikrobeililaitetta (DMD). DMD:lle saapuvasta valorintamasta voidaan valita haluttu kuvio heijastettavaksi solunäytteeseen. Eksitaatiovalon ohjausta varten happianturiin lisättiin kaupallinen videoprojektori, joka sisälsi DMD:n. Videoprojektorin elektroniikkaan tehtiin lisäys ja fokusointioptiikka vaihdettiin räätälöityyn versioon. Uudella laitteistolla voitiin tarkkailla 1 mm x 1 mm kokoisuuden alueen happikonsentraatiota luotettavasti. Erot happipitoisuuksissa huomattiin selvästi 250 µm x 250 µm kokoisten alueiden välillä. Eksitaatiovalon resoluutioksi saatiin 0,1 mm. Tulevaisuudessa DMD:n valonohjausta voidaan käyttää myös muihin tarkoituksiin, kuten mikroskoopin valonlähteenä.

ABSTRACT

ISMO KORHONEN: Digital micromirror device in optical oxygen sensing

Tampere University

Master of Science Thesis, 63 pages

February 2020

Master's Degree Programme in Electrical Engineering

Major: Biomedical Engineering

Examiners: Professor Emeritus Jukka Lekkala and M.Sc. Hannu Välimäki

Keywords: digital micromirror device, optical oxygen measurement, oxygen sensitive fluorophore, *in vitro*

Tampere University has developed an efficient fluorescence-based oxygen sensor which measures oxygen concentration in cell culture medium. The purpose of this thesis was to increase spatial accuracy of the oxygen sensor in question. This was achieved by adding a digital micromirror device (DMD) which enabled optical guiding of excitation light. The desired pattern to reflect towards the cell sample can be chosen from the incident light arriving on the DMD. In this work a commercial video projector containing a DMD was integrated to the oxygen sensor. The electronics of the video projector were modified and the focusing optics changed to a customized version. The new equipment was able to reliably monitor the oxygen concentration of an area of 1 mm x 1 mm. Differences in oxygen concentrations were clearly observed between 250 μm x 250 μm areas. The resolution of the excitation light was 0.1 mm. In the future, the DMD based light control system can also be used for other purposes, such as a microscope light source.

ALKUSANAT

Tämä diplomityö on laadittu Tampereen yliopiston informaatioteknologian ja viestinnän tiedekunnassa. Työ oli osa Business Finlandin (entinen TEKES) rahoittamaa Ihmisen va-raosat -projektia.

Kiitokset diplomityön tarkastuksesta emeritusprofessori Jukka Leikkalalle. Kiitokset dip-lomityön ohjaamisesta ja tarkastuksesta tutkija Hannu Välimäelle. Kiitokset Jarmo Ver-holle elektroniikan rakentamisesta.

Suoritin diplomityöni mittaukset tutkimusapulaisena huhtikuusta 2017 vuoden loppuun silloisen Tampereen teknillisen yliopiston biolääketieteen tekniikan tiedekunnassa. Avus-tin kaupallisen DMD:n valinnassa ja tein testausmittauksia laitteistolla. DMD:n integ-roinnissa hapenmittauslaitteistoon keskityin valonohjauksen toteuttamiseen ohjelmisto-tasolla.

Kotkassa, 17.2.2020

Ismo Korhonen

SISÄLLYSLUETTELO

1.	JOHDANTO	1
2.	TEORIA	5
2.1	Digitaalinen mikrobeililaite.....	5
2.1.1	DMD:n toimintaperiaate	7
2.1.2	DMD:n kokoonpano	9
2.1.3	DMD:n toimintavarmuus	11
2.1.4	DMD:n sovellukset	12
2.2	Optinen hapen mittaus.....	13
2.2.1	Fluorofori	13
2.2.2	Happipitoisuutta kuvaavia tekijöitä	16
2.2.3	Optinen happianturi.....	19
3.	MENETELMÄT	23
3.1	DMD:n valinta.....	23
3.1.1	Kaupallisten DMD:iden vertailu.....	23
3.1.2	Valitun DMD:n valaisukoneisto	24
3.1.3	Valitun DMD:n ohjaus.....	28
3.2	DMD:n integrointi happianturiin	29
3.3	Happianturin paikkakalibrointi mikroskooppikuvaan.....	32
3.3.1	Paikkakalibroinnin toteutuksen pohdinta.....	33
3.3.2	Kirjallisuudessa käytetty paikkakalibrointimenetelmä	34
3.3.3	Paikkakalibroinnin toteutus.....	35
3.3.4	Paikkakalibroinnin toimivuuden testaus	35
3.4	Fluoresenssilaitteiston testaus	36
3.4.1	Ledien spektrit.....	36
3.4.2	Fluoresenssimittauksen suorituskyvyn määrittäminen	36
3.4.3	Fluoresenssi-ilmaisun paikkariippuvuuden määrittäminen	38
3.4.4	Fluoresenssilaitteiston skannauskyky	38
3.4.5	Eksitaatiovalon resoluutio.....	39
4.	TULOKSET	40
4.1	Paikkakalibroinnin testaus.....	40
4.2	Ledien spektrit.....	42
4.3	Fluoresenssimittauksen suorituskyvyn määrittäminen.....	43
4.4	Fluoresenssi-ilmaisun paikkariippuvuuden määrittäminen.....	49
4.5	Fluoresenssilaitteiston skannauskyky	51
4.6	Eksitaatiovalon resoluutio	53
5.	YHTEENVETO	56
	LÄHTEET.....	60

LYHENTEET JA MERKINNÄT

CCD	charge-coupled device, valoherkkä kenno
CMOS	complementary metal oxide semiconductor, komplementtimetallioksidipuolijohde
DLP	digital light processing, digitaalinen valon käsittely
DMD	digital micromirror device, digitaalinen mikropeililaite
in vitro	elävän organismin ulkopuolella, kasvatusmaljassa
in vivo	elävässä organismissa
LED	light-emitting diode, valodiodi
MEA	microelectrode array, mikroelektrodihila
MEMS	micro electro-mechanical system, pienikokoinen sähkömekaaninen järjestelmä
Na ₂ SO ₃	natriumsulfiitti
PtOEPK	platinum(II) octaethylporphyrin ketone, happiherkkä fluorofori platina(II)oktaetyyliporfyriiniketoni
PtTFPP	platinum-tetra-fluoro-phenyl-porphyrin, happiherkkä fluorofori platina(II)-5,10,15,20-tetrakis-(2,3,4,5,6-pentafluorofenyyli)-porfyriini
SRAM	static random access memory, staattinen lukumuisti
TI	Texas Instruments
TIR	total internal reflection, kokonaisheijastuminen

1. JOHDANTO

Ihmisen varaosat -tutkimusohjelma pyrki kehittämään kantasolututkimusta ja -teknologiaa Tampereella. Tutkimusohjelma alkoi vuonna 2011 ja päättyi kesäkuussa 2019. Tutkimusohjelmassa oli mukana biotieteiden ja lääketieteen tekniikan instituutti BioMediTech, jossa toimi yhteistyössä silloiset Tampereen teknillinen yliopisto ja Tampereen yliopisto. Tutkimusohjelman rahoittajana oli Business Finland. Tavoitteena oli parantaa kantasoluihin perustuvia ihmisen hoitomenetelmiä, kehittää lääkkeiden turvallisuuden ja toimivuuden testausta ja samalla nopeuttaa uusien lääkkeiden kehittämisprosessia, sekä eläinkokeiden vähentäminen ja korvaaminen. Projektissa tehtiin biomateriaali-, anturi-teknologia-, biolääketiede- ja kantasolututkimusta keskittyen luu- hermo-, silmä- ja sydämkudokseen. [1]

’Ihmisen varaosat – sensorit’ -projekti keskittyi antureihin. Projektissa työskentelevän tutkimusryhmän tavoitteena oli kehittää kantasolututkimusta helpottavaa mittausteknologiaa. Solujen mittaukseen kuuluu olennaisena osana hapenmittaus, jonka laitteiston kehittämiseen tämä työ tehtiin. Ihmissolut tarvitsevat soluhengitykseen perustuvaan energiantuottoonsa happikaasua. Happimolekyylien kulutus solun ympäristöstä paljastaa onko solu elossa ja kuinka aktiivisesti solu toimii. Solujen aktiivisuuden tarkastelun lisäksi hapenmittausta voidaan käyttää lääkkeiden vaikutusten havainnointiin. Lääkeaine saattaa muuttaa solun ja kudoksen toimintaa ja vaikuttaa solujen hapenkulutukseen.

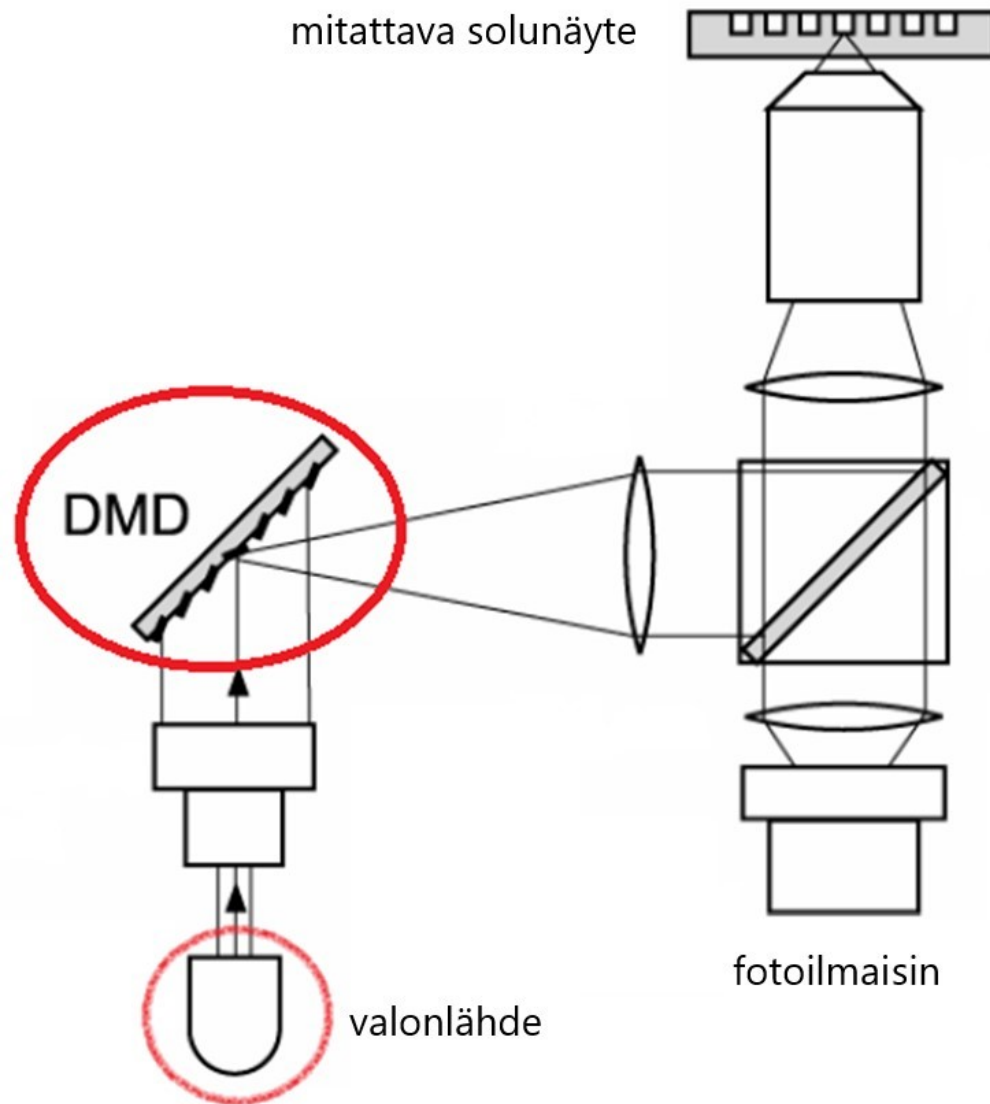
BioMediTechillä on aiemmin kehitetty fluoresenssiin perustuva happipitoisuuden mittausteilaite [2], jota voidaan käyttää solujen kasvatusliuoksen happikonsentraation tarkkailuun ja säätöön. Happianturi sijaitsee soluviljelyalustan alapuolella. Soluviljelyalustan päälle valmistetaan noin 500 nm:n paksuinen, happea läpäisevä polymeerikerros, joka sisältää fluoresoivaa ainetta. Hapen läsnäolo pienentää fluoresoivan aineen fluoresenssin intensiteettiä ja nopeuttaa fluoresenssin vaimenemista. Ilmiön avulla voidaan päätellä hapen paikallinen konsentraatiovaihtelu polymeerikerroksessa. Hapen määrä polymeerikerroksessa on taas suorassa suhteessa ympäröivän alueen hapenkulutukseen soluviljelmässä.

Työn aiheena oli lisätä BioMediTechin tutkimusryhmän kehittämän happikonsentraation mittausteilaiteiston tulovaloon digitaalista mikrobeiliä (DMD) käyttävä kohdennus. DMD:n avulla pystytään valitsemaan soluviljelymaljalta vain ne solualueet, joiden hapenkulutusta halutaan tutkia. Kirjallisuudessa on aiemmin DMD:itä käytetty fluoresenssiin perustuvassa hapenmittauksessa elävää organismia tutkittaessa (*in vivo*) [3, 4] ja so-

luja tutkittaessa soluviljelymaljalla (*in vitro*) [5]. Tutkimusryhmän kehittämä hapenmittauslaitteisto pystyy kuitenkin keräämään aikaisemmin käytettyjä mittauslaitteistoja tehokkaammin mittausdataa suurella signaali-kohinasuhteella [2].

Ennen hapenmittausta eksitaatiovalon kohdennus on paikkakalibroitava mikroskooppikuvaan näytteestä. Paikkakalibroinnissa selvitetään yksittäisten DMD:n mikropheilien ja niitä vastaavien eksitaatiovalon sijaintien välinen yhteys. Paikkakalibroinnin jälkeen mikroskooppikuvasta voidaan valita mitattavat alueet. DMD-kohdennettua valaisua voitaisiin käyttää paikallisen happikonsentraatio mittauksen lisäksi myös soluviljelymaljan yläpuolella olevan mikroskoopin valonlähteenä.

Työn tarkoituksena oli DMD:n avulla tuoda hapenmittauslaitteeseen teknilliset laatuvaatimukset täyttävä, tarpeeksi tehokas ja kollimoitu valonsäderintama. Kuvassa 1 on esitetty solujen hapenkulutusta mittaava laitteisto. Kuvassa on ympyröitynä osakokonaisuus, johon tämä työ liittyi.



Kuva 1. Kaaviokuva solujen hapenkulutusta mittaavasta laitteistosta ja valon kulku laitteistossa.

Työn keskeisenä tehtävänä oli etsiä kaupallinen, tarkoitukseen sopiva DMD ja integroida se toimintakuntoon valonlähteen ja hapenmittauslaitteen väliin. Tämä tehtävä piti sisällään sopivan valonlähteen valinnan (merkattu himmeämmällä viivalla kuvassa 1), mittausprotokollan laatimisen, mittauksien suorittamisen sekä paikkakalibroinnin kehittämisen eksitaatiovalon kohdennukselle. Työn tuloksena syntyi MATLAB-ohjelma, jolla voidaan valita mitattavat alueet mikroskooppikuvasta.

Työn toinen luku käsittelee DMD:tä – sen toimintaperiaatetta, toimintavarmuutta ja sovelluksia – ja optista hapen mittausta – sen toimintaperiaatetta keskittyen tähän työhön liittyvän happianturin käyttötarkoitukseen. Kolmannessa luvussa valitaan sopiva DMD, tutustutaan sen ominaisuuksiin, kuvaillaan sen integrointi hapenmittauslaitteistoon, ja esitellään testit, jotka suoritettiin uuden laitteiston toimintakyvyn arvioimiseksi. Kolmannessa luvussa myös suunnitellaan happianturin paikkakalibrointi mikroskooppikuvaan.

Neljännessä luvussa käydään läpi paikkakalibrointitestin ja toimintakykytestien tulokset. Viides luku sisältää yhteenvedon työstä.

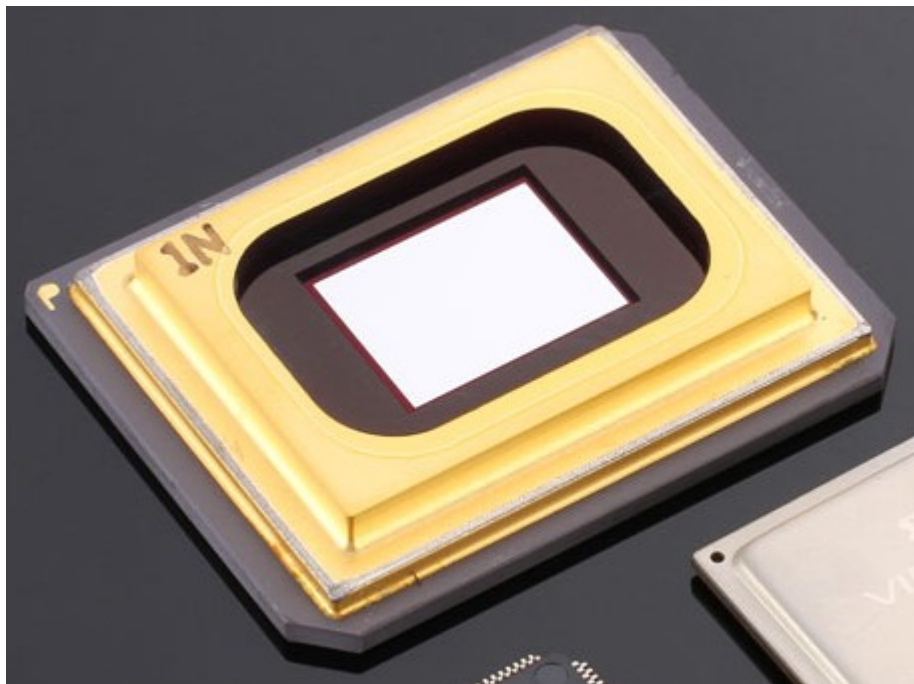
2. TEORIA

2.1 Digitaalinen mikrobeililaite

Hane *et al.* [6] luettelee eri toimintaperiaatteilla toimivia ja eri käyttösovelluksiin tarkoitettuja mikrobeililaitteita. Tässä työssä keskityimme DMD:hen. DMD on mikro-optoelektromekaaninen laite, jossa valoa heijastavien peilien asentoa kontrolloidaan sähköisesti.

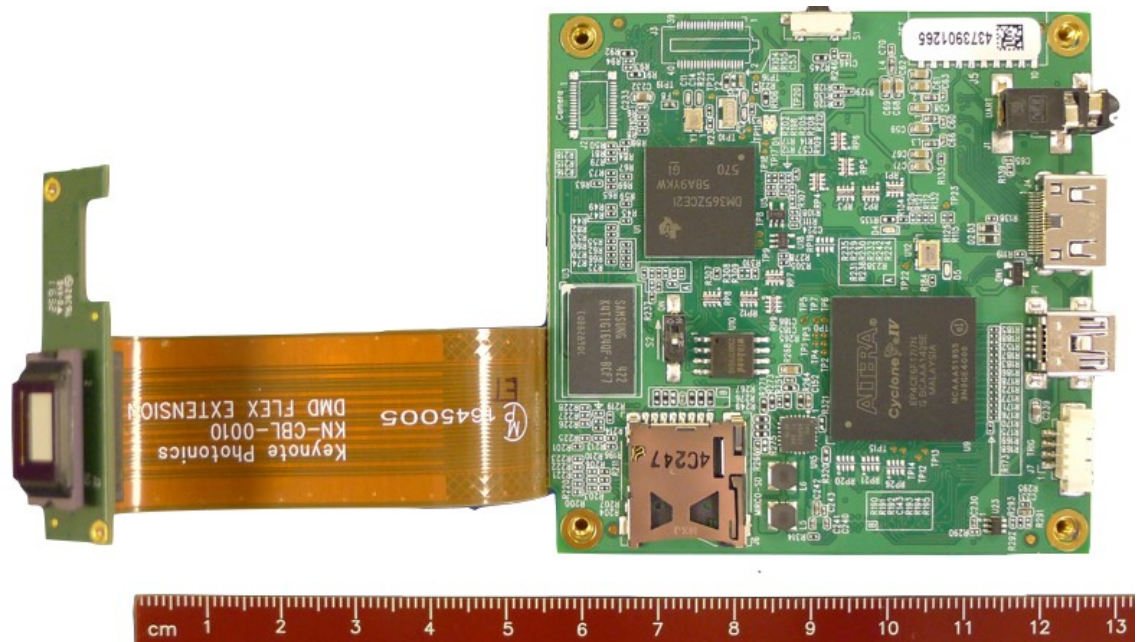
DMD:n keksi Larry Hornbeck vuonna 1987 työskennellessään Texas Instruments:llä (TI) [6, 7]. TI kaupallisti DMD:n osana digitaalinen valon käsittely (DLP) -tekniikkaa vuonna 1996 [6, 7]. Nykypäivän DMD:t koostuvat yli miljoonasta pienen pienestä kytkettävästä peilistä.

Kuvassa 2 on esitetty DMD-siru. DMD-siruja on erikokoisia. Kaikissa on keskellä suorakulmainen DMD-alue (kuvassa 2 valkoinen suorakulmio), jossa mikrobeilit sijaitsevat. DMD:n vastakkaisilla reunoilla ovat pinnit (eivät näy kuvassa), joiden kautta DMD on sähköisesti yhteydessä muuhun osaan DMD-sirusta. DMD-siru yhdistetään suurempaan kokonaisuuteen sirun kääntöpuolella sijaitsevien pinnien välityksellä.



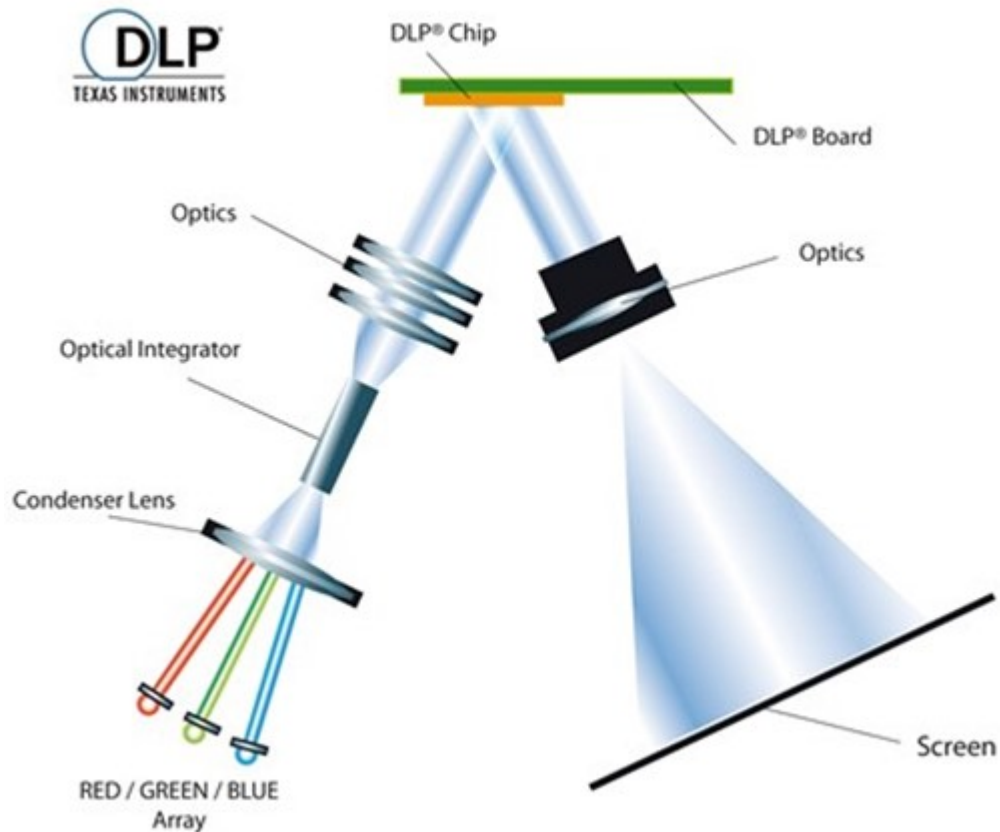
Kuva 2. DMD-siru. [8]

Kuvassa 3 on esitetty DMD-siru, joka on yhdistetty taipuisan johtimen kautta ohjauspiirikortille. Näin DMD ja DMD:n ohjaus videoprojektoreissa saadaan sijainniltaan erotettua toisistaan.



Kuva 3. DMD-siru (vasemmalla) ja sen ohjauspiirikortti (oikealla). [9]

Kuvassa 4 on esitetty DMD:n käyttö videoprojektorissa. Valonlähteenä voi olla lamppu värisuotimella, LED tai laser. DMD:lle saapuva valo yritetään optiikan avulla tehdä mahdollisimman yhdensuuntaiseksi ja tasaisesti jakautuneeksi. DMD:n mikrobeilien heijastava pinta on alumiinia [10]. DMD-sirulle ladataan binäärikuvia, joiden pikselit määräävät heijastavatko niitä vastaavat mikrobeilit valon optiikan kautta näytölle vai eivät. Peilien lukumäärä määrää siis resoluution.



Kuva 4. Yksinkertaistettu kuva videoprojektorin toiminnasta. Ledien valo kulkee optiikan kautta DMD:lle, josta se heijastuu optiikan kautta näytölle. [11]

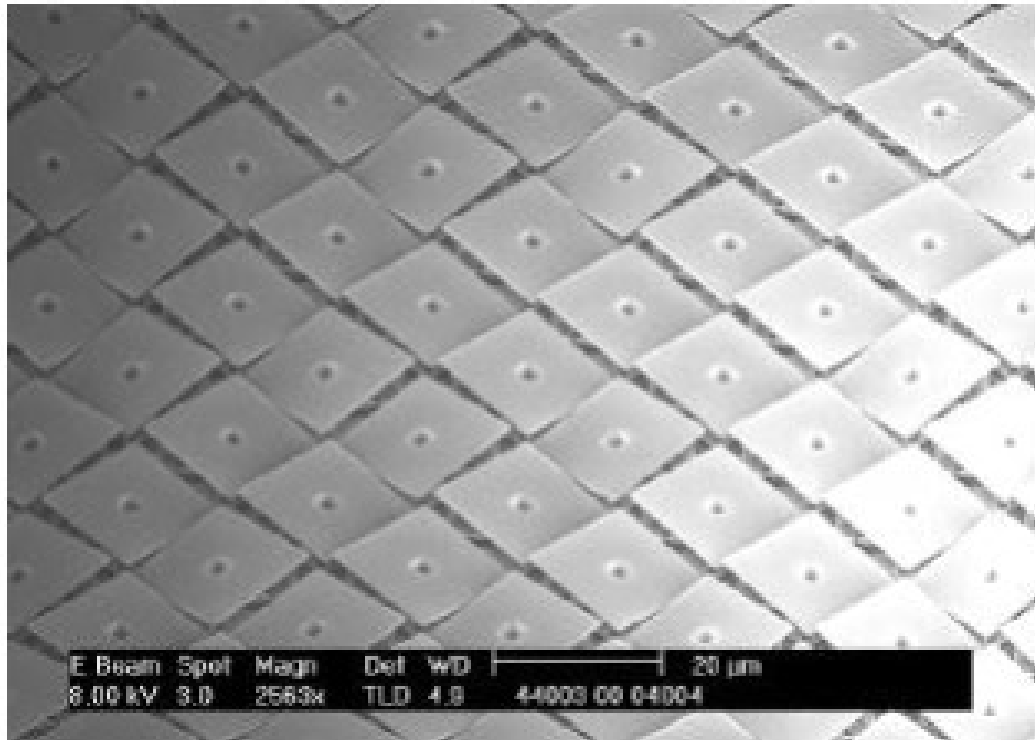
Värikuvia voidaan syntetisoida näytölle heijastamalla DMD:n kautta punaista, vihreää ja sinistä valoa. Ihmissilmä ei pysty havaitsemaan nopeampia kuin ~ 60 Hz ($\sim 16\,600$ μ s) muutoksia [6]. Koska mikropeilien kytkeminen heijastamaan valoa näytölle tai pois on kestoltaan mikrosekuntien luokkaa, voidaan ihmissilmälle luoda illuusio värien ja harmaansävyjen skaalasta [12].

Vaihtoehtona DMD:lle on nestekidenäyttö. Nestekidenäytössä nestekidekerrokseen tuodaan valoa. Nestekidenäyttöä voidaan dynaamisesti muokata päästämään valo läpi tietyistä kohtaa ja toisesta ei. Nestekidenäytön pikselin jännitettä muuttamalla voidaan säätää kuinka paljon pikseli päästää valoa läpi eli mikä on pikselin harmaasävy. Nestekidenäytön toiminta perustuu valon polarisaatioon, joten puolet valolähteen valotehosta menetetään jo alussa, kun valo kulkee polarisaatiosuotimien läpi. Samalla absorboitunut valo muuttuu lämmöksi kuumentaen nestekidenäyttöä [12]. Tässä työssä keskitytään yksinomaan DMD:tä käyttävään tekniikkaan.

2.1.1 DMD:n toimintaperiaate

DMD:n mikropeili toimii kuin kiikkulauta. Laitteen ollessa virraton peilit kiikkuvat vapaasti tasapainopisteensä eli 0° kulman läheisyydessä. Virran ollessa kytkettynä peilit ovat kallistuneet joko enemmän valonlähteen suuntaan $+X^\circ$ tai poispäin valonlähteestä

toiseen ääripäähän $-X^\circ$ kulmaan. Positiivista (+) ja negatiivista (-) asentoa kutsutaan on- ja off-asennoiksi. Aikaisemmissa DMD:n versioissa X oli 10 astetta, nykyisissä laitteissa X on yleensä 12 astetta [12]. Kuvassa 5 on esitetty DMD:n mikrobeilit kuvattuna yläpuolelta pyyhkäisyelektronimikroskoopilla. Kuvassa mikrobeilit ovat kallistuneet joko on- tai off-asentoon. On-asennossa peili heijastaa valon haluttuun suuntaan. Off-asennossa pois heijastuva valo kerätään lämpönieluun: aineeseen, joka absorboi valon kokonaan itseensä ilman heijastuksia. Lämpönielussa valoenergia muuttuu lämpöenergiaksi.



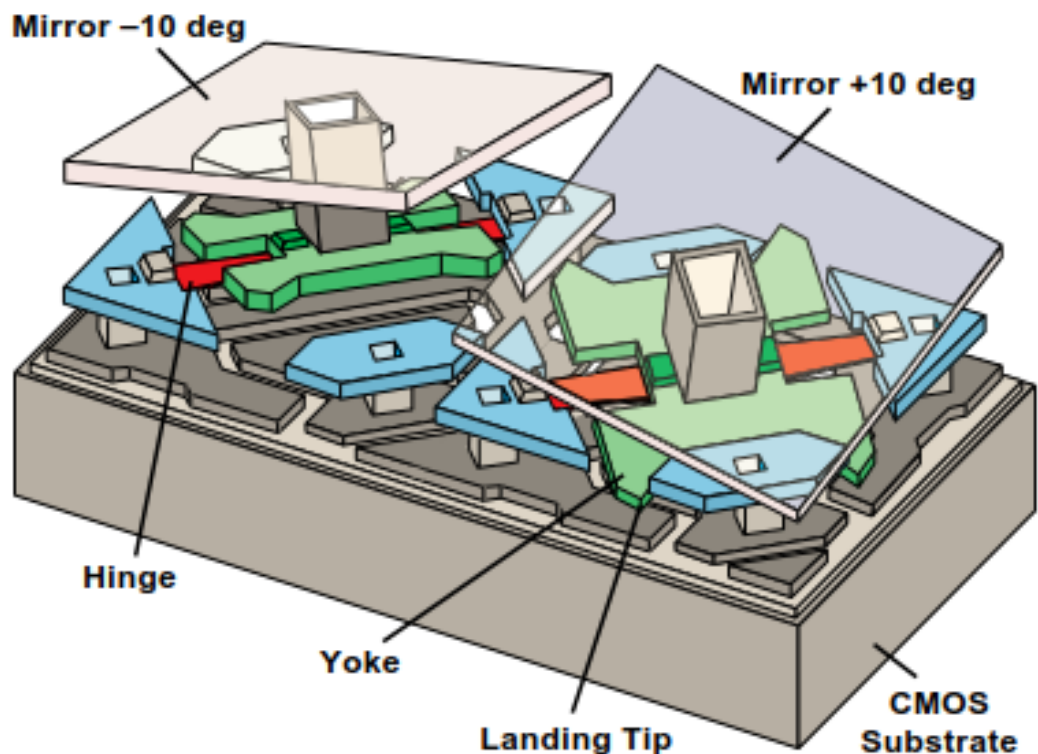
Kuva 5. Pyyhkäisyelektronimikroskoopin kuva DMD:n mikrobeileistä. [13]

Jokaisen mikrobeilin alapuolella (katso kuva 7) on staattinen käyttömuistipiiri (SRAM-piiri), joka on toteutettu komplementaarisen metallioksidipuolijohde (CMOS) -teknologian avulla. Muistisoluun on tallennettu mikrobeilin seuraava asento. Peilien ajoituspulsin saapuessa mikrobeilit vapautuvat hetkeksi yhdenaikaisesti asennostaan ja ottavat sitten muistisoluun talletetun asennon. Mikrobeili pysyy asennossaan sähköisen vetovoiman vaikutuksesta. [12]

DMD:n muistiin kirjoittaminen tapahtuu tyypillisesti peilirivikohtaisesti. Jos halutaan vaihtaa yhden peilin asentoa, kyseisen peilirivin kaikille peileille täytyy tallettaa asentotiedot. DMD on jaettu useiden kymmenien vierekkäisten peilirivien muodostamiin lohkoihin. Peilien ajoituspulssi kohdistuu kerrallaan koko lohkokoon. Kyseisen lohkon muistisoluihin ei saa kirjoittaa ajoituspulssin aikana, eikä määrättyinä ajanjaksoina ajoituspulsin ympärillä. [14]

2.1.2 DMD:n kokoonpano

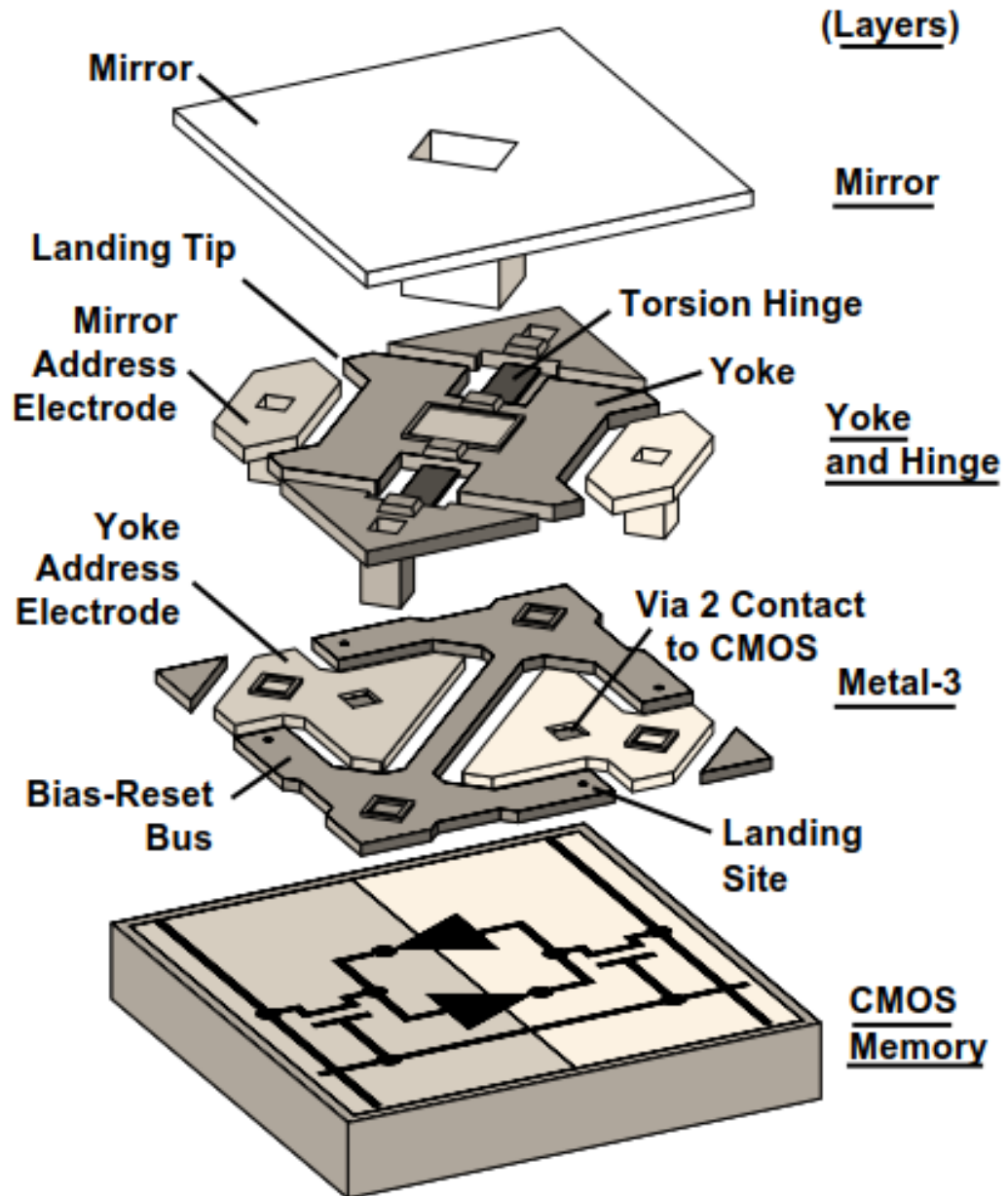
CMOS SRAM -muistisolun yläpuolella on mikropiirien valmistuksen tapaan ohutkalvo-kasvatusta, optista litografiaa ja etsausta toistamalla rakennettu MEMS-rakenne. Tarkempi kuvaus mikrobeilien valmistuksesta löytyy Hornbeckin artikkeleista [7, 12]. Kuvassa 6 on esitetty lähikuva kahdesta DMD:n mikrobeilistä off- ja on-asennoissa. Heijastavat peilit on esitetty kuvassa läpinäkyvinä, jotta niiden alapuoliset osat näkyisivät paremmin. Peilit ovat kääntyneet nivelten (punainen väri) varassa 10 astetta sivuun nollatasosta. Peilit ovat kiinni alustassa (vihreä väri), ja liikkuvat mukana alustan kallistuessa. Kallistussuunnassa sijaitseva, sähköisesti varautunut elektrodi (sininen väri) ja sen alapuolinen osa vetävät peiliä ja alustaa sähköstaattisella vetovoimalla puoleensa, joka on suurempi kuin nivelten vääntymistä vastustava voima. Peilin kallistuminen pysähtyy siihen, kun alustan päät osuvat samassa sähköisessä potentiaalissa olevaan tukirakenteeseen.



Kuva 6. DMD:n kaksi mikrobeiliä eri kallistuskulmissa. Heijastavat peiliosat on tehty läpinäkyviksi, ja alla sijaitsevan kerroksen rakenneosat on värjätty. [12]

Kuvassa 7 on esitetty yhden mikrobeilin räjäytyskuva. Päälimmäinen kerros muodostuu heijastavasta peili-osasta. Seuraavassa kerroksessa näkyy alusta, johon peili on kiinnittynyt. Alusta pyörii siinä kiinni olevien nivelien varassa. Nivelten toisissa päissä on paikallaan olevat tuet. Alustan kummallakin puolella sijaitsevat erillään elektrodit, jotka sähköisesti varautuessaan vetävät peiliä puoleensa. Kolmannessa kerroksessa on suuri tukirakenne, jonka päihin toisen kerroksen alustan päissä sijaitsevat jousit osuvat ensimmäisinä peilin kallistuessa. Tukirakenteen kummallakin puolella näkyvät metallirakenteet,

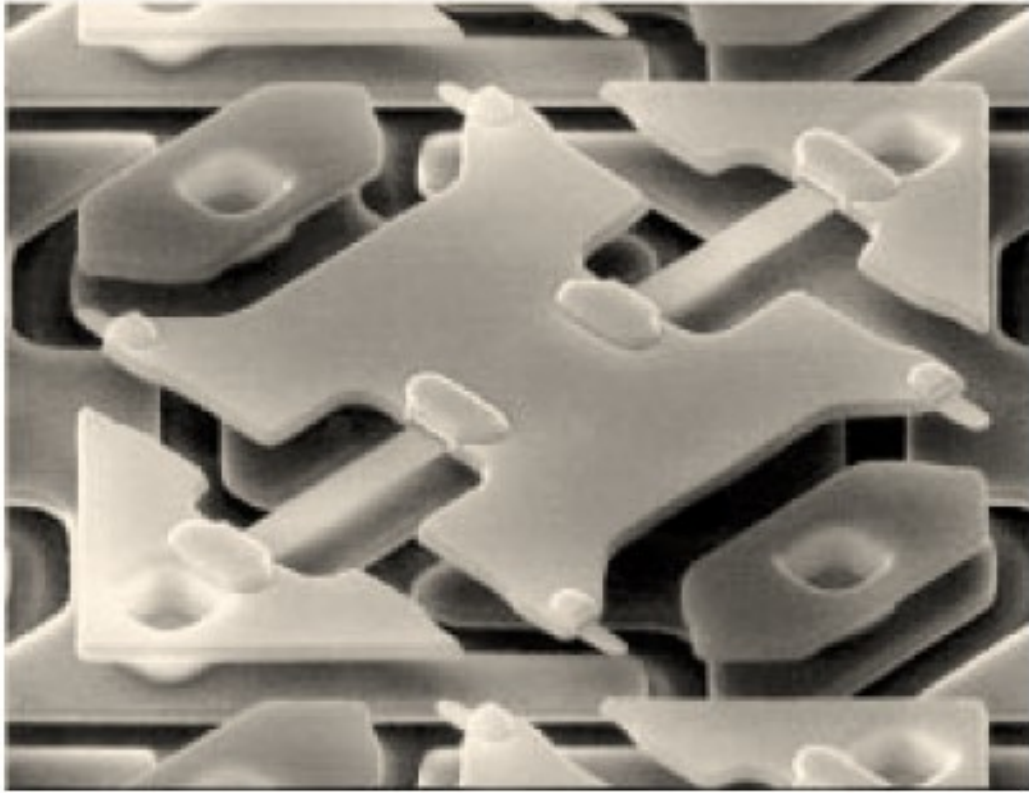
jotka sähköisesti yhdistävät alimman kerroksen logiikkapiiriin toisen kerroksen elektrodeihin. Kyseiset metallirakenteet vetävät sähköisesti varautuessaan toisen kerroksen alustaa puoleensa.



Kuva 7. DMD:n mikromeilin räjäytyskuva. Mikromeilin eri kerroksissa sijaitsevat rakennneosat on erotettu toisistaan. Alimman kerroksen logiikkapiiri on näkyvillä. [12]

Kuvassa 8 on pyyhkäisyelektronimikroskoopilla otettu lähikuva DMD:stä, jonka mikromeileistä on irrotettu ensimmäisen kerroksen peiliosat. Mikromeilin toinen kerros erottuu selvästi: alusta keskellä, alustan päissä olevat jouset, sekä nivelet, nivelten tukiosat ja elektrodit. Myös kolmas, metallikerros on osittain näkyvillä. Peilin nivelten palautusvoima ei välttämättä pysty voittamaan alustan ja tukirakenteen molekyylien välillä vallitsevia Van der Waals -voimia ja pintavoimia [12, s. 6]. Ongelmaan on kehitetty ratkaisu:

Peiliosaan ja alustaan saapuva ajoituspulssi saa alustan jouset taipumaan. Kun ajoituspulssi kytkeytyy pois päältä, jouset pyrkivät suoristumaan. Syntyvä työntövoima on tarpeeksi suuri irrottamaan alustan tukirakenteesta. [12]



Kuva 8. Pyyhkäisyelektronimikroskoopin kuva DMD:n mikrobeilin toisesta kerroksesta. Peilikerros on otettu pois. [12]

2.1.3 DMD:n toimintavarmuus

DMD kestää hyvin iskuja ja tärinää. DMD kestää myös mikrobeilin nivelen väsymistä ja normaalissa huoneenlämmössä nivelen virumista, vaikka mikrobeili vääntyisi jatkuvasti samaan suuntaan, eli pysyisi pelkästään on- tai off-asennossa. Mikrobeilin jumittumista alustansa tukirakenteeseen ehkäisee Van der Waalsin voimia vähentävä aine, jota lisätään ohut kerros DMD:n valmistusvaiheessa, DMD:n peilien päissä oleva jousi, joka avustaa työntövoimallaan peilin irtoamista kosketuspinnasta, sekä DMD:n yläpuolella sijaitseva ilmatiivis lasikerros, ikkuna, joka pitää mikrobeilit kuivina ja ehkäisee veden kapillaariitiivistymistä, ja samalla pitää pölyhiukkaset poissa mikrobeileista [15, s. 4]. [13]

DMD:n optinen hyötysuhde lasketaan kertomalla keskenään neljä tekijää [16]: DMD:n täyttöaste, ikkunan läpäisevyys, peilipinnan heijastuvuus ja diffraktiohyötysuhde. DMD:n mikrobeilit eivät ole aivan vierekkäin, vaan noin yhden mikrometrin nimellisetäisyydellä toisistaan. DMD:n täyttöaste kertoo kuinka suuri osa valosta saavuttaa heijastuspinnan, kun kaikki mikrobeilit ovat on-asennossa. Osa valosta heijastuu ilman ja lasin rajapinnassa. DMD:n ikkunan läpäisevyys halutuille aallonpituuksille on yli 95 %

[16]. DMD:n peilipinnan heijastuvuus riippuu materiaalista, osa valosta absorboituu. Tavallisen alumiinin heijastuvuus on 92 % 500 nm:n aallonpituudelle. DMD:n pinta on hilaomainen (katso kuva 5) aiheuttaen diffraktiota. Diffraktiohyötysuhde kertoo sen, kuinka suuri osa peileistä heijastuvasta valosta heijastuu oikeaan suuntaan, kun kaikki mikropeilit ovat on-asennossa. Ikkunan läpäisevyys, peilipinnan heijastuvuus ja diffraktiohyötysuhde riippuvat valon aallonpituudesta. Lisäksi DMD:n optiseen hyötysuhteeseen vaikuttaa myös mikropeilin asettumisajasta johtuva viive [12], jos DMD:n binäärikuvaa muutetaan alle millisekunnin välein.

Valo kulkee DMD:tä käyttävässä laitteistossa väliaineenaan ilma ja lasi. Mittauslaitteisto on kuorensa sisässä suojassa tarkoituksenmukaisettomilta valonsäteiden suuntaa muuttavilta tekijöiltä: naarmuuntumiselta ja optisen tiheyden vaihteluilta, kuten paikallisilta lämpötilan, paineen ja kosteuden vaihteluilta, pölyhiukkasilta ja vesipisaroilta.

Mahdollinen lämpötilan nousu asettaa rajan käytettävälle valonlähteen maksimaaliselle teholle. Hetkellinen mikropeilin pinnan lämpötila on pidettävä alle kriittisen lämpötilan +150 °C. Korkea lämpötila vaikuttaa laitteiston käyttöikänsä. Laseria valonlähteenä käytettäessä hetkellisiä lämpötilahuippuja voidaan arvioida lämpötilamalleilla. Lämpötilaan vaikuttaa laserin pulssisuhde, pulssitaajuus, aallonpituus ja teho, sekä viilennyslaitteisto. [17]

2.1.4 DMD:n sovellukset

Suurin DMD:n käyttökohde on videoprojektorit, joiden resoluutio on mikropeilien määrä, eli tällä hetkellä parhaimmillaan 2560×1600 kuvapikseliä. DMD:itä käytetään myös tulostimissa, televisioissa, tietoliikenteessä, spektroskopiassa, digitaalisessa litografiassa, 3D-tulostimissa ja 3D-skannereissa [18]. Nopeaa ja tarkkaa valon kohdentamista tarvitaan lisäksi monilla tutkimusaloilla. DMD:n käyttö valon kohdentamisessa on suhteellisen helppo toteuttaa, tarjoaa suuren joustavuuden, ja mahdollistaa valon kohdentamisen samanaikaisesti moneen eri kohtaan laajalla alueella.

DMD:tä käytetään aaltorintamavääristymän korjauksessa [19] ja lasersäteiden muotoilussa. DMD:llä voidaan poistaa vääristymää, joka syntyy valon kulkiessa sirottavan väliaineen, kuten biologisen kudoksen läpi. Peilit eivät aiheuta värvirhettä, joten DMD on melko hyvä ratkaisu. DMD-kohdennusta käyttämällä solujen kasvattamiseen sopivan 3D-hydrogeelin valmistuksessa on saavutettu ~100 µm:n resoluutio [20] ja maskittomassa fotolitografiassa ~20 µm:n resoluutio [21].

Kudostasolla valon kohdistukseen on tarjolla kaupallisia versioita, jotka eivät käytä DLP-teknologiaa [22]. Niissä valonlähteenä on laser, LED tai lamppu, ja kohdistus tapahtuu suoraan tai valokuidun tai nestevalonjohtimen avulla. Riippuen kaupallisesta versiosta, valoa voidaan kohdistaa tietyn kokoisena ja muotoisena yhdelle tai useammalle alueelle. Laitteita on mahdollista yhdistää myös näytteen alapuolella tai yläpuolella sijaitsevaan

mikroskooppiin. Voimakkaita lasereita voidaan käyttää myös leikkaamiseen. DMD pystyi korvaamaan mainitut kaupalliset vaihtoehdot laserleikkausta lukuun ottamatta.

DMD:tä on käytetty solujen optisessa hapenmittauksessa *in vivo* [3, 4] ja *in vitro* [5]. Solujen mittaamisen lisäksi DMD:tä voisi käyttää solujen stimulointiin ja manipulointiin valolla. Valoherkkiä molekyylejä osataan tuoda soluihin tai tuottaa keinotekoisesti itse soluissa. Stimuloivia ja manipuloivia yhdisteitä pystytään sulkemaan valoherkkien molekyyliarakenteiden sisään, jotka avautuvat valon vaikutuksesta samalla vapauttaen sisältämänsä yhdisteet. Valokohdennus on sijainniltaan täsmällisempää kuin sähköinen stimulointi, joka helposti leviää ei-toivotuille alueille. [23]

2.2 Optinen hapen mittaus

Solu- ja kudostason mittakaavassa yksi tehokas tapa mitata hapen määrän muutoksia perustuu valoon. Toisin kuin perinteiset sähkökemialliset hapenmittaustavat, valoon perustuvalla hapenmittauksella on parempi signaali-kohinasuhde [24], se on nopea ja vähemmän invasiivinen menetelmä [25, 3], ei ole yhtä herkkä kontaminaatiolle eikä se kuluta mittaamaansa happea [2]. Hapen määrää voidaan mitata valon avulla mittauslaitteistolla, joka perustuu happimolekyylistä riippuvaan, yleisimmin reversiibeliin fotoluminenssin tukahduttamiseen.

Solujen hapenkulutukseen vaikuttaa mitokondrioiden toiminta, apoptoosi, tautien ja erilaisten ärsykkeiden aiheuttamat metaboliset muutokset, sekä erilaisten yhdisteiden toksikologiset vaikutukset. Hapenkulutuksen havainnointiin liittyvän tutkimuksen lisäksi monesti halutaan varmistua, että soluilla on jatkuvasti käytössään riittävästi happea. Myös joissakin tutkimuksissa, kuten iskemiamalleissa, halutaan tuottaa vallitsevissa olosuhteissa tarkoituksellisesti aiheutettuja ajallisesti tarkkoja hapenmuutoksia.

Eksitaatiovalon kohdentamiseen pienelle alueelle tarvitaan tarkkuutta, jonka DMD mahdollistaa. DMD:itä käytetäänkin solujen hapenkulutusta optisesti mittaavissa laitteistoissa. Verrattuna koko mittausalueen eksitaatioon, DMD-ohjattu valonkohdistus vähentää taustakohinaa ja parantaa tarkkuutta. Lisähyötynä soluja vahingoittavaa reaktiivista hapen singlettilä muodostuu vähemmän.

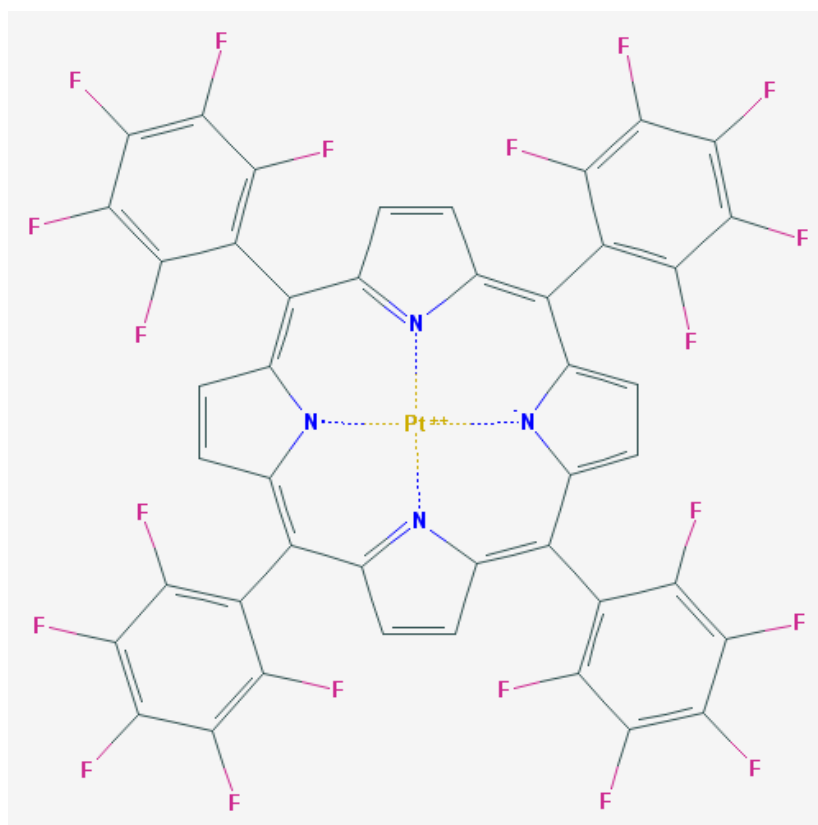
2.2.1 Fluorofori

Fluorofori on fluoresoiva kemiallinen yhdiste, joka vastaanottaessaan tietyn aallonpituista säteilyä virittyy eli eksitoiduu, ja tämän jälkeen lähettää eli emittoi tietyn aallonpituista sähkömagneettista säteilyä. Yleensä emission aallonpituus on suurempi ja energia pienempi kuin eksitaation.

Emission ja eksitaation välissä on viive, jota voidaan tilastollisesti kuvata käsitteellä fluoresenssin elinaika. Eksitaation jälkeinen, lukuisista fluoroformolekyylien emissiosta johdettu kokonaisfluoresenssi pienenee eksponentiaalisesti ajan funktiona. Fluoroformin elinaika kertoo kauanko kestää, että virittyneistä fluoroformeista $1/e$ ($\approx 0,368$) on palannut perustilaansa. Fluoroformin kvanttisaanto kuvaa kuinka monta emissiofotonia saa keskimäärin aikaiseksi yksi absorboitunut eksitaatiofotoni. Kvanttisaanto on pienimmillään nolla ja suurimmillaan yksi.

Hapenmittauksessa käytettävän fluoroformin on oltava happiherkkä. Fluoroformia kutsutaan happiherkäksi silloin, kun happimolekyylin läheisyys voi estää sen fluoresenssin. Prosessia, jossa happimolekyyli estää fluoroformin fluoresenssin, kutsutaan sammutukseksi, ja happimolekyyliä sammuttajaksi. Hapenmittauksessa pyritään käyttämään fluoroformeja, joiden kvanttisaanto sekä eksitaatio- ja emissioaallonpituuskaistojen välinen etäisyys ovat suuria. Myös fluoresenssin elinajan on oltava sopivan pitkä hapenmittausta varten.

Kuvassa 9 on esitetty happiherkkä fluoroformi platina(II)-5,10,15,20-tetrakis-(2,3,4,5,6-pentafluorofenyyli)-porfyriini (PtTFPP). PtTFPP on kompleksiyhdiste, jonka keskusionina on kaksiarvoinen positiivisesti varautunut platina-ioni. Keskusionia ympäröi neljä typpiligandia. PtTFPP:n fluoresenssia sammuttaa hapen läsnäolo.

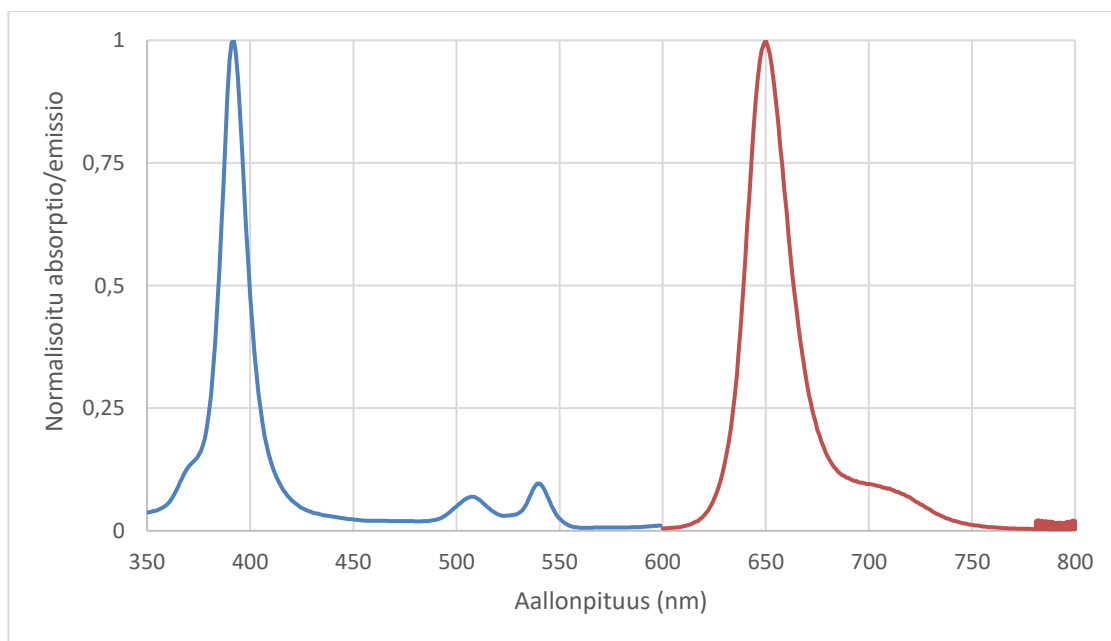


Kuva 9. PtTFPP-fluoroformin rakennekaava. [26]

Fluoresenssin intensiteettiin ja elinaikaan vaikuttavat fluoroforin polarisaatio, koko ja muoto, sekä fluoroforin ympäristö: sammuttajat, liuottimen viskositeetti, ionikonsentraatio, pH, ympäristön hydrofobisuus, paine, lämpötila ja sähköinen potentiaali. Sammuttajien vaikutusta määrittävät niiden pitoisuus ympäristössä, liukenevuus fluoroforia sisältävään faasiin, sekä niiden diffuusio faasissa eli se kuinka nopeasti ne pääsevät liikkumaan paikasta toiseen sammuttamaan fluoroforeja.

Mills [27] määrittelee kolme tekijää happiherkkyydelle eli hapen kyvylle sammuttaa fluoresenssi: Ensimmäinen tekijä on fluoroforin elinaika ilman happea. Toinen tekijä on fluoroforia sitovan aineen liukenevuus- ja diffuusionopeus hapelle eli läpäisevyys hapelle. Kolmas tekijä on sammutustehokkuus, jota voidaan kuvata kvanttisaannolla. Happiherkkyys riippuu siis paljolti fluoroforista ja sitä sitovasta aineesta. Platina-porfyyriineja käytetään happimittauksissa happiherkkinä fluorofoireina, koska niillä on sopiva elinaika [27], hyvä kvanttisaanto [27], hyvä happiherkkyys polystyreiniinimatriiseissa [27], niillä on lineaarinen Stern-Volmer –yhtälö [27], kirkas emissio [24], ne eivät ole niin herkkiä kemikaali- ja lämpötilan vaihteluille [24], ja ne pysyvät melko hyvin kiinnittyneinä polystyreeniin.

Kuvassa 10 on esitetty kirjallisuudesta [28] löytyvä PtTFPP-fluoroforin normalisoitu absorptio ja normalisoitu emissio aallonpituuden funktiona. PtTFPP-fluoroforilla on yksi suuri absorptioikaista 392 nm:n ympärillä, ja kaksi pientä absorptioikaista, joiden huiput ovat 507 nm ja 540 nm. Virittyneen PtTFPP-fluoroforin emissioikaista on 650 nm:n ympärillä. PtTFPP:n fluoresenssin elinaika on noin 50 μ s ilman happea huoneenlämmössä [29, s. 77].



Kuva 10. PtTFPP:n absorptio- (vasemmalla ja keskellä) ja emissiospektri (oikealla).

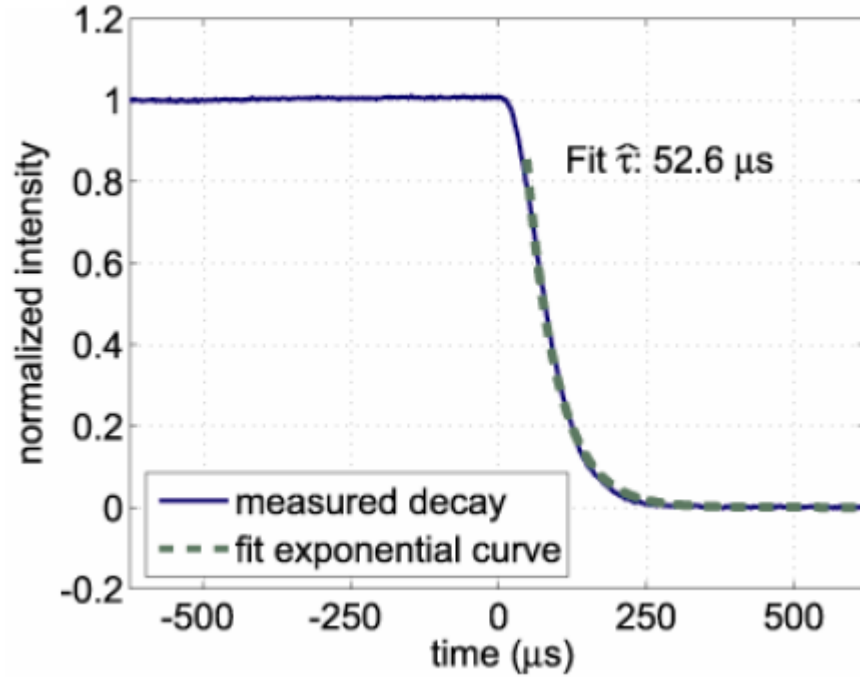
PtTFPP:n viritys on tehokkainta 392 nm:n aallonpituudella, mutta lähellä UV-aluetta olevan aallonpituuden käyttö soluviljelmissä on ongelmallista. Kasvattamalla polymeerikerroksen paksuutta ja PtTFPP:n konsentraatiota polymeerissä saadaan suurempi emissiosignaali, koska fluoroforeja on silloin kokonaisuudessaan enemmän. Fluorofori-polymeerikerroksen paksuutta ei voi kuitenkaan kasvattaa loputtomasti. Samoin PtTFPP:n myrkyllisyyden takia sen konsentraatiota ei kannata lisätä. Sydänlihassolut näyttävät kestävän paremmin polymeerikerroksesta irtoavaa fluoresoivaa ainetta kuin siihen kuolevat hermosoluviljelmät [30]. Fluoresoivan aineen pitoisuus onkin pidettävä pienenä siihen asti, kunnes keksitään tapa sitoa fluoresoiva aine paremmin polymeerikerrokseen.

2.2.2 Happipitoisuutta kuvaavia tekijöitä

Happiherkkien fluoroforien aikaansaaman fluoresenssin intensiteetti pienenee sitä enemmän mitä enemmän happea on läsnä. Fluoresenssin intensiteetin mittauksella voidaan siis määrittää hapen määrä ympäristössä. Hapen läsnäolo lyhentää myös fluoresenssin elinaikaa, sillä mitä kauemmin happiherkkä fluorofori on virittyneessä tilassa, sitä suuremmalla todennäköisyydellä happimolekyylillä sammuttamaan sen fluoresenssin. Eli myös fluoresenssin elinajan mittauksella voidaan määrittää hapen määrä ympäristössä. Vaikka fluoresenssin intensiteetin mittaus on helpompi toteuttaa, fluoresenssin elinajan mittaus ei ole riippuvainen valoaltistuksen kestosta ja voimakkuuden vaihteluista tai fluoroforin pitoisuuden ja fluorofori-polymeerimatriisin paksuuden vaihtelusta, eikä siihen vaikuta fotohajoaminen [24, 25]. Huang *et al.* näytti, että 10 tunnin testin aikana fluoresenssin intensiteetti laski 40 %, kun taas fluoresenssin elinaikaa kuvaava absorptio-emission vaihe-ero kasvoi vain 6 % [25, s. 144].

Kirjallisuudessa fluoresenssin elinajan määrittämiseen DMD:n avulla on käytetty kahta eri mittausmenetelmää: fluoresenssin säteilyvoimakkuuden suoraa mittausta [4, 24] ja vaihe-eromittausta [3, 5, 25]. Kumpaakin mittausmenetelmää käytetään *in vitro*- ja *in vivo* -sovelluksissa.

Fluoresenssin elin aika voidaan määrittää suoraan tarkastelemalla fluoresenssin säteilyvoimakkuutta eksitaation päätyttyä. Fluoresenssin elin aika τ (μ s) vastaa aikaa, joka kestää, kun fluoresenssin säteilyvoimakkuus hiipuu maksimistaan $1/e$ -arvoonsa. Fluoresenssin säteilyvoimakkuuden suorassa mittauksessa mittaussignaali saattaa olla hyvin heikko lisäten satunnaisten mittausvirheen suuruutta. Tästä johtuen mittausdataan on tehtävä käyrän sovitus. Mittausvirheen pienentämiseksi mittaus on myös toistettava useaan kertaan. Kuvassa 11 on havainnollistettu fluoresenssin säteilyvoimakkuuden suoraa mittausta. Kuvassa on esitetty fluoresenssin säteilyvoimakkuus ajan funktiona. Ajanhetkellä nolla eksitaatio on päättynyt ja fluoresenssi on lähtenyt vaimenemaan. Vaimentumiskäyrään on sovitettu käyrä, jonka avulla fluoresenssin elin aika τ on määritetty.



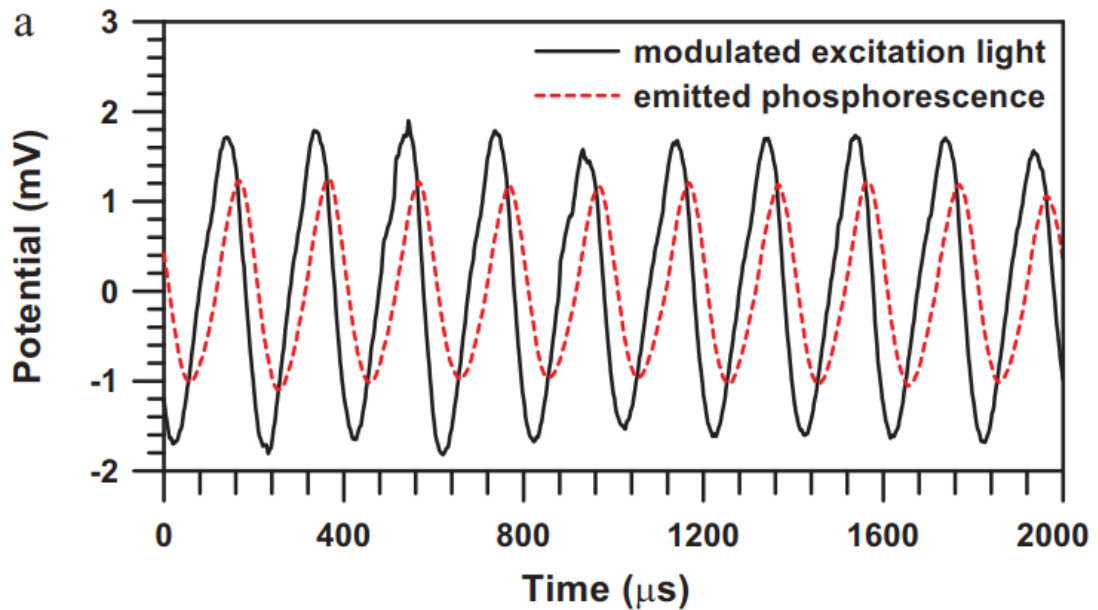
Kuva 11. Fluoresenssin säteilyvoimakkuuden suorassa mittauksessa fluoresenssiemission intensiteetin laskukäyrään on sovitettu käyrä, jonka perusteella elinaika τ on laskettu. [24]

Fluoresenssin säteilyvoimakkuuden suoralla mittauksella määritetään paikallinen happipitoisuus käyttäen Stern-Volmer –yhtälöä:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{SV}^L [O_2] = 1 + K_{SV}^G pO_2 \quad (1)$$

jossa τ_0 (μs) on fluoresenssin elinaika hapettomassa ympäristössä, K_{SV}^L ($l \times mg^{-1}$) ja K_{SV}^G (kPa^{-1}) ovat Stern-Volmerin sammutusvakiot nesteessä ja kaasussa, $[O_2]$ ($mg \times l^{-1}$) on hapen pitoisuus nesteessä, ja pO_2 (kPa) on hapen osapaine kaasussa. Yhtälön 1 mukaan happipitoisuus on verrannollinen fluoresenssin elinaikaan. Yhtälö 1 pätee yhtä hyvin myös fluoresenssin intensiteetin mittaukseen: Yhtälön 1 lausekkeet ovat yhtä pitäviä lausekkeen I_0/I kanssa, jossa I_0 on fluoresenssin intensiteetti hapettomassa ympäristössä, ja I on mitattu fluoresenssin intensiteetti. [25]

Vaihe-eromittauksessa taas mitataan kuinka paljon myöhemmin eksitaatiofotonin vastaanottamisen jälkeen fluorofori tilastollisesti emittoi fotonin. Vaihe-eromittauksessa eksitaatiovalo on pulssitettu sinimuotoiseksi aalloksi tai kanttiaalloksi, jossa osan syklistä eksitaatiovalo on päällä ja osan pois päältä. Tällöin myös emissiovalo pulssittuu. Kummallakin aallolla on sama taajuus. Eksitaation ja emission välisen ajallisen viiveen takia emissiovalon aaltoilu on kuitenkin eri vaiheessa kuin eksitaatiovalon aaltoilu. Vaihe-eroa on havainnollistettu kuvassa 12, jossa 5000 Hz:n taajuiset eksitaatio- ja emissiosignaalit ovat keskenään eri vaiheessa.



Kuva 12. Eksitaatiovalon (musta yhtenäinen viiva) ja emissiovalon (punainen katkoviiva) välinen vaihe-ero [25].

Vaihe-eromittauksella määritetään ympäristössä vallitseva hapen osapaine käyttäen Stern-Volmer -yhtälöä:

$$\frac{\phi_0}{\phi} = 1 + K_{sv} pO_2 \quad (2)$$

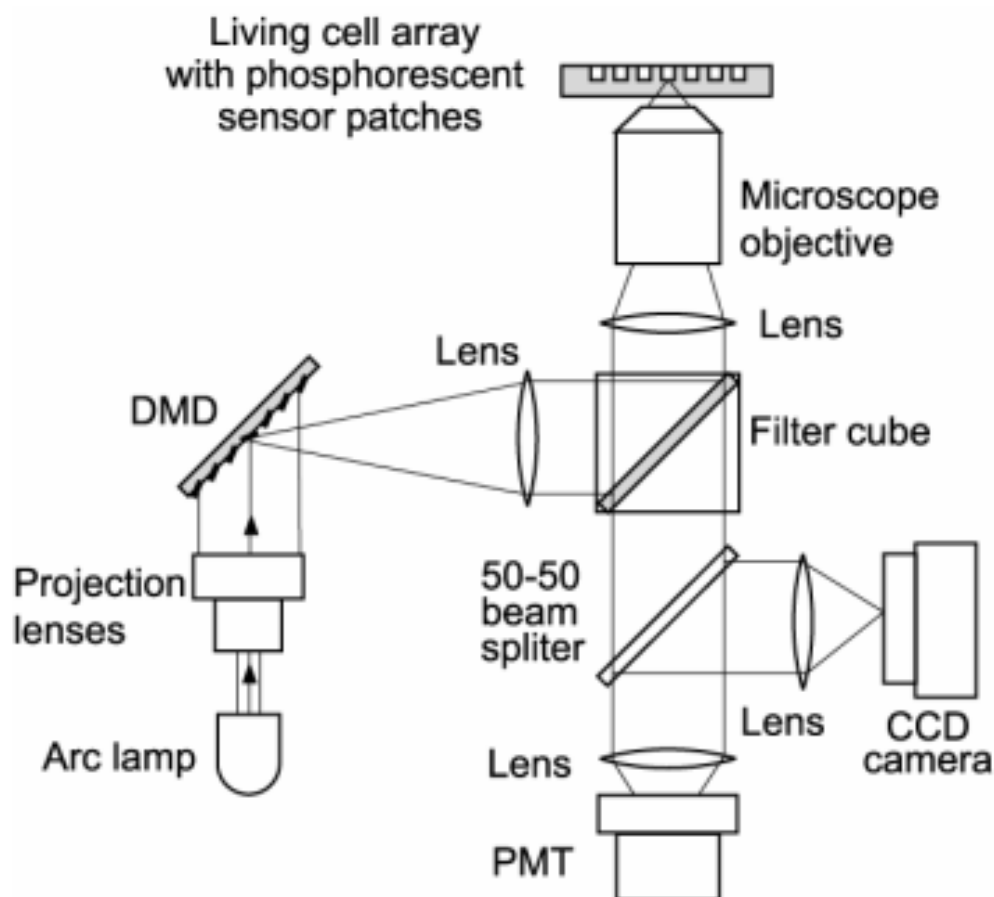
jossa ϕ_0 (°) on eksitaation ja emission vaihe-ero ilman happea, ϕ (°) on mitattu vaihe-ero hapen läsnä ollessa, K_{sv} (kPa⁻¹) on Stern-Volmerin vakio, ja pO_2 (kPa) on hapen osapaine [2]. Mitä enemmän happiherkän fluoroforin ympäristössä on happea, sitä pienempi on vaihe-ero. Yhtälön 2 mukaan vaihe-ero on huippuarvossaan 0 %:n happipitoisuudessa, ja pienenee happipitoisuuden kasvaessa, aluksi nopeammin ja happipitoisuuden kasvaessa yhä hitaammin [25]. Stern-Volmerin vakio määritetään tekemällä vaihe-eromittauksia tunnetuissa hapen osapaineissa. Kun mittauslaitteistolle on määritelty Stern-Volmerin vakio, voidaan hapen osapaine määrittää mittaamalla vaihe-ero samoissa olosuhteissa, samalla fluoroforia sitovalla polymeerimatriisilla ja samalla eksitaatiolla.

Kaikki fluoresenssiin perustuvat happianturit ovat alttiita lämpötilan vaihteluille. Lämpötilan nousu vähentää fluoresenssin elinaikaa ja samalla pienentää vaihe-eroa [2], koska terminen sammutus kasvaa ja lämpötilan noustessa happea diffundoituu nopeammin paikalle. Stern-Volmerin vakion määrittäminen ja sitä seuraavat vaihe-eromittaukset pitäisi siis tehdä samassa lämpötilassa. Vaihe-eroon perustuva mittaus on laitteistoltaan yksinkertaisempi ja edullisempi kuin fluoresenssin säteilyvoimakkuuden suora mittaus [2, 25].

2.2.3 Optinen happianturi

Happiherkkien fluorofoorien elinaika on tyypillisesti kymmenien mikrosekuntien luokkaa. Mikropeilin kääntyessä on- tai off-asentoon se valaisee hetken muita näytteen alueita. Mikropeilit vaihtavat kuitenkin asentonsa nopeasti. Peilin kytkeytyminen asennosta toiseen kestää noin 5 μ s ja tämän jälkeinen mekaaninen asettuminen noin 11 μ s [31, s. 16, 32, s. 19]. Fluoresenssin elinaikaan tulee tällöin maksimissaan 5 μ s:n systemaattinen virhe, joka voidaan kuitenkin kalibroida pois. Tässä työssä eksitaation kytkeminen päälle ja pois päältä tehtiin DMD:n sijaan valonlähteellä, koska ledin kytkeminen päälle ja pois päältä on myös nopeaa, ja koska vaihe-ero on yksinkertaista määrittää, kun eksitaatiovalon pulssitus tehdään valonlähteellä. Ledillä ja mittaufotodiodilla on myös omat aikavaihtonsa, jotka täytyy kalibroida pois.

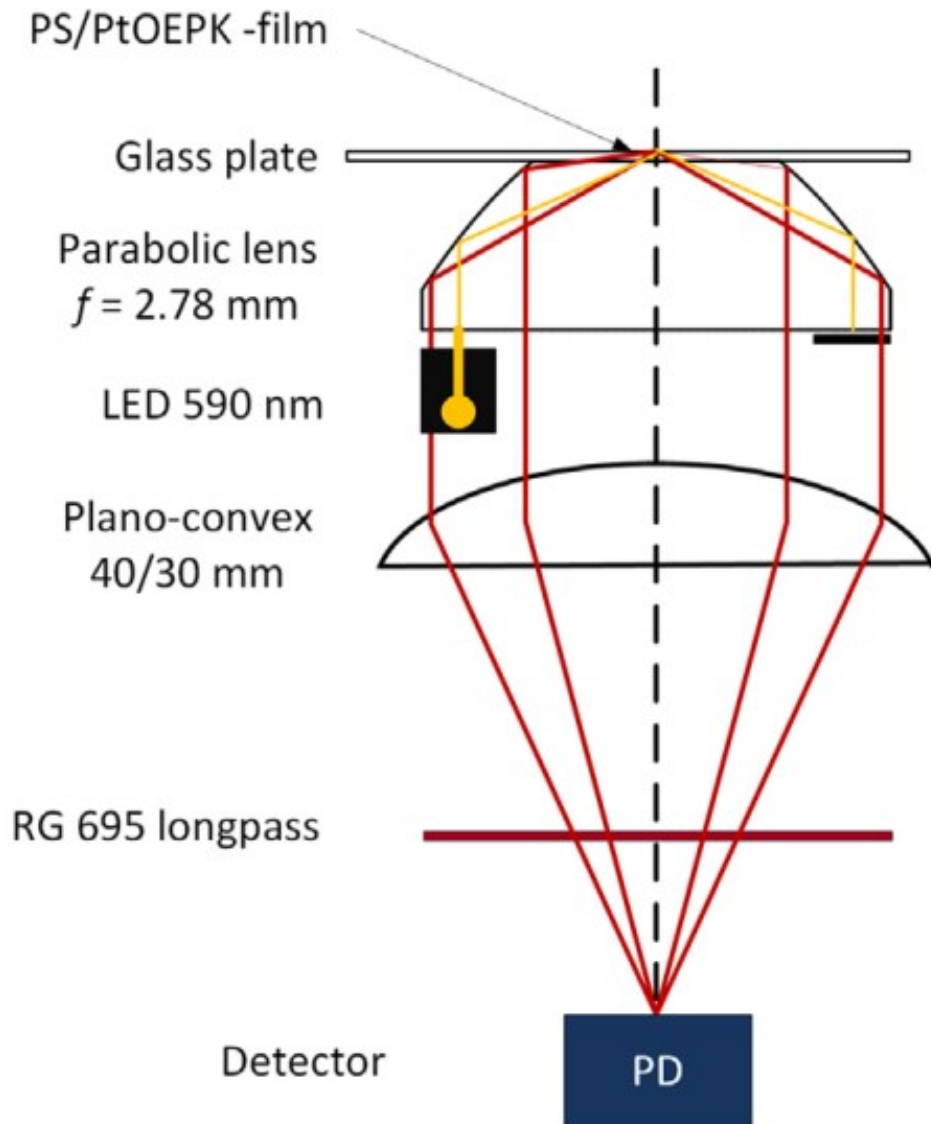
Kuvassa 13 on esitetty kaaviokuva Chao *et al.* [24] käyttämästä optisesta hapenmittauslaitteistosta. Heidän mittausmenetelmänsä perustui fluoresenssin elinajan määrittämiseen mittaamalla fluoresenssin säteilyvoimakkuutta ajan funktiona. Heidän mittauslaitteistossaan eksitaatiovalo kulki valonlähteestä optiikan kautta DMD:lle, josta DMD:n binäärikuva heijastui optiikan kautta mikroskooppiin. Mikroskoopissa dikromaattinen peili heijasti eksitaatiovalon objektiivin kautta näytteelle. Näytteestä emittoituva valo kulki takaisin mikroskooppiin objektiivin ja dikromaattisen peilin läpi säteenjakajalle, josta puolet emissiovalosta jatkoi matkaansa valomonistinputkelle ja puolet taittui CCD-kameralle. CCD-kamera kuvasi näytealuetta emissiovalon aallonpituudella. Valomonistusputkeen kytketty oskilloskooppi tallensi emissiovalon aikaansaaman signaalin. Eksitaatiovalon kanttiaaltomainen pulssitus tehtiin DMD:llä, koska valonlähteenä käytetyn kaarilampun on-off vaihto olisi ollut hidasta ja epävakaata.



Kuva 13. Kaaviokuva optisesta hapenmittauslaitteistosta. [24]

BioMediTechin hapenmittauslaite on kehitetty mittaamaan solujen hapenkulutusta *in vitro* ja monitoroimaan yleistä solukasvatusnesteen happitilaa, jota ulkoisesti halutaan kontrolloida. Mittausmenetelmä perustuu vaihe-eroon. BioMediTechin hapenmittauslaite eroaa muista hapenmittauslaitteistoista paraboloidisen linssinsä ansiosta, joka on optimoitu keräämään suuren osan fluoroforin emittoimasta valosta. Samalla tarve suurille fluoroforin ja eksitaatiovalon määriille vähenee. Linssisysteemi ei ole myöskään niin herkkä likaantumiselle. [2]

Kuvassa 14 on esitetty kaaviokuva BioMediTechin hapenmittauslaitteistosta. Paraboloidinen linssi on leikattu päältä tasaiseksi ja siihen on asetettu lasinäyte, jonka päällä sijaitsee fluorofori-polymeerikerros. Valonlähteenä oli LED, jonka lähettämä eksitaatiovalo heijastettiin fluorofori-polymeerimatriisiin paraboloidisen linssin reunan kautta. Polymeerikerroksesta heijastunut eksitaatiovalo absorboitiin pois paraboloidisen linssin ulkopuolella. Emissiovalo heijastui paraboloidisen linssin reunoista ja ohjautui optiikan kautta fotoilmaisimelle. Kuvassa 14 on käytetty leimana fluoroforia platina(II)oktaetyyliporfyriiniketoni (PtOEPK).

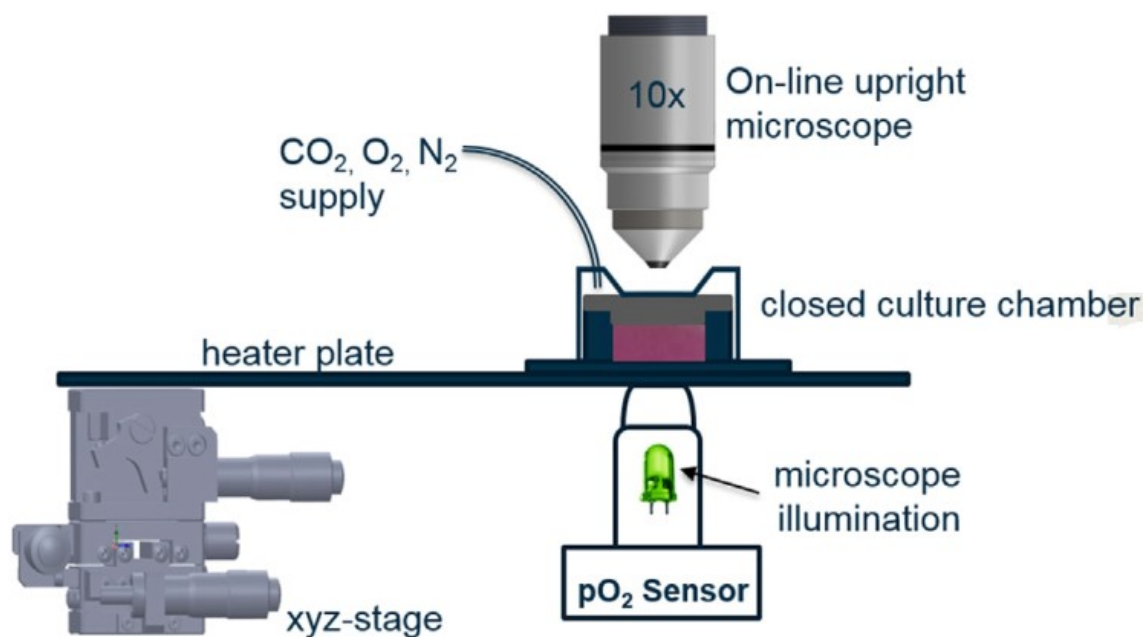


Kuva 14. BioMediTechin kehittämän optisen happianturin toimintakaavio. Keltaisella viivalla on kuvattu eksitaatiovalon kulku ledistä näytteeseen ja edelleen muovipalaan, joka esti heijastuvan eksitaatiovalon pääsyn fotoilmaisimelle. Punainen viiva kuvaa emissiovalon kulkua fluorofoori-polystyreenikalvosta fotoilmaisimelle. Aallonpituudet on sovitettu toiselle fluoroforille (PtOEPAK) kuin tässä työssä käytetylle (PtTFPP). [2]

Fluorofoori sekoitettiin polystyreenikalvoon, joka on kaasuja läpäisevä. Hapen on päästävä liikkumaan mahdollisimman vapaasti polymeerikerroksessa, jotta sen pitoisuus vastaisi polymeerikerroksen yläpuolella vallitsevaa happipitoisuutta. Ohut läpinäkyvä polymeerikalvo ei häiritse solujen mikroskooppitarkastelua. Fluoroforit ovat myrkyllisiä useille soluille, ja osa fluoroformolekyyleistä saattaa päästä kulkeutumaan solukasvatusnesteseen, joten fluoroforin pitoisuus polymeerikalvossa on pidettävä pienenä.

BioMediTechin happianturia käytetään osana soluviljelmän havainnointijärjestelmää. Kuvassa 15 on esitetty solukasvatuskammio ja sen ympärillä oleva laitteisto. Tutkittavien solujen yläpuolella on järjestyksessä solunkasvatusnestettä, kontrolloitu kaasuseos, lä-

pinäkyvä solukasvatusastian kansi, ilmaa, sekä mikroskooppi. Tutkittavien solujen alapuolella on järjestyksessä biologinen kiinnityskalvo auttamassa solujen kiinnittymistä solukasvatusastian pohjaan, fluoroforilla konsentroitunut polymeerikalvo, solukasvatusmaljan pohja tai mahdollisesti lasinen, paikallisia sähköpotentiaalin vaihteluita mittaavan mikroelektrodihilan (MEA) alusta paksuudeltaan 0,18–1 mm, mahdollisesti läpinäkyvä lämmitinlevy paksuudeltaan 0,5 mm, immersioöljyä pitämässä optinen yhteys lasin ja paraboloidisen linssin välillä, sekä hapenmittauslaitteisto. Soluviljelmää hapenmittauslaitteiston ja mikroskoopin välissä voidaan liikuttaa kaikkiin suuntiin.



Kuva 15. Solukasvatuskammio ja sen ympärillä oleva laitteisto. [2]

MEA koostuu solunkasvatusmaljan pohjassa sijaitsevista elektrodeista, jotka koostaan riippuen mittaavat solujoukkojen, yksittäisten solujen tai jopa solun osien sähköistä aktiivisuutta reaaliaikaisesti. Jos BioMediTechin happianturin tarkoituksena on havainnoida soluja yhdessä MEA:n kanssa, joitakin rajoitteita on otettava huomioon: Happikonsentraation muutoksia ei voida mitata elektrodien kohdalta, jonne eksitaatiovalo ei pääse MEA:n alapuolelta. Elektrodien päälle asetettu fluorofori-polymeerikalvo saattaa vaimentaa elektrodien mittaamaa signaalia. Elektrodikohtiin ei kannata lähettää eksitaatiovaloa, jos valonlähteenä käytetään laseria, koska voimakas valo voi aiheuttaa valojännitteiden elektrodissa tai muuttaa elektrodin sähkönjohtokykyä lämpötilan nousun vuoksi [33].

3. MENETELMÄT

3.1 DMD:n valinta

3.1.1 Kaupallisten DMD:iden vertailu

BioMediTechin hapenmittauslaitteistoon hankittiin kaupallinen DMD. Tarjolla olleista vaihtoehtoista päädyttiin DMD:hen, jossa oli jo valmiina valonlähde, optiikka ja DMD:n ohjausjärjestelmä, ja jonka laitteistoon oli mahdollista tehdä omia muutoksia. Päädyimme kahteen halvimpaan TI:n tarjoamaan, tieteelliseen tutkimukseen tarkoitettuun videoprojektoriin. Lopullisen päätöksen DMD:n valinnasta teimme näiden kahden vaihtoehdon välillä.

DLP LightCrafter Evaluation Module (DLP LightCrafter) on videoprojektori, joka sisältää DMD-sirun DLP 0.3 WVGA DMD (DLP3000), DLP3000:n digitaalisen ohjaimen DLPC300, sekä DLPC300:n käyttöohjelmiston DLPR300. DLP LightCrafter 4500 Evaluation Module (DLPLCR4500EVM) on videoprojektori, joka sisältää DMD-sirun DLP 0.45 WXGA DMD (DLP4500), DLP4500:n digitaalisen ohjaimen DLPC350, sekä DLPC350:n käyttöohjelmiston DLPR350.

Taulukossa 1 on verrattu DLP LightCrafter:n ja DLPLCR4500EVM:n ominaisuuksia keskenään. Vihreällä värillä on merkitty ominaisuus, joka on suotavampi happianturiin integroitaessa, ja punaisella värillä epäsuotavampi ominaisuus. Kontrastisuhde kuvaa näytön kirkkausarvojen suhdetta, kun kaikki mikrobeilit ovat on-asennossa ja kun kaikki mikrobeilit ovat off-asennossa. Kirkkauden tasaisuus taas kertoo sen, kuinka lähellä heijastetun kuvan tummin kohta on kirkkaudeltaan vaaleinta kohtaa, kun heijastetussa kuvassa kaikki mikrobeilit ovat on-asennossa. DLP3000 ja DLP4500 ovat monilta ominaisuuksiltaan samanlaisia. DMD-siruilla on yhtä suuret mikrobeilit, mutta DLP4500:lla niitä on enemmän. DLPLCR4500EVM:n ledien tehonkulutus ja kirkkaus ovat yli viisin kertaisia verrattuna DLP LightCrafter:iin. Myös DLPLCR4500EVM:n kontrastisuhde ja kirkkauden tasaisuus ovat huomattavasti parempia kuin DLP LightCrafter:n. Toisaalta DLP LightCrafter on pienempikokoinen, halvempi ja sillä on muistitilaa enemmän kuin DLPLCR4500EVM:llä.

Taulukko 1 Videoprojektorien DLP LightCrafter ja DLPLCR4500EVM ominaisuuksien vertailu. [31, 32, 34, 35]

Ominaisuus	DLP LightCrafter	DLPLCR4500EVM
Kirkkaus (lumen)	10; 25; 30	150
Mikropeilin sivun pituus (µm)	7,6	7,6
Mikropeilin kytkentäaika (µs)	16	16
Laitteen koko (mm)	116,5 × 65 × 23	121,6 × 98 × 47,7
Mikropeilien lukumäärä	608 × 684	912 × 1140
Hinta (\$)	600	1300
Flash-muisti (MB)	128	32
DMD-piirin tehonkulutus (mW)	200	442
Ledien tehonkulutus (W)	0,6; 1,85; 2,25	15
Kontrastisuhde	685:1	1000:1
Kirkkauden tasaisuus (%)	70	90

Kumpaankin videoprojektoriin pystyy vaihtamaan valonlähteeksi laserin. DLPLCR4500EVM on kooltaan isompi mutta sisällöltään väljempi. Laitteen osien purku ja vaihtaminen suoritetaan käsin, jolloin DLPLCR4500EVM:ä olisi helpompi ja selkeämpi käsitellä ja se olisi vähemmän riskialtis vahingoille.

DLP4500:n DMD:n optinen hyötysuhde on 68,6 % kaikille 420–700 nm aallonpituuksille. Se on hiukan parempi kuin DLP3000:n 67,9 %. DLP4500:n DMD:n optinen hyötysuhde saadaan kertomalla keskenään DMD:n täyttöaste 92 % (DLP3000:lle 92,5 %), diffraktiohyötysuhde 86 %, pinnan heijastuvuus 89,4 % (DLP3000:lle 88 %) ja ikkunan läpäisevyys 97 % [31, s 16, 36, s. 5].

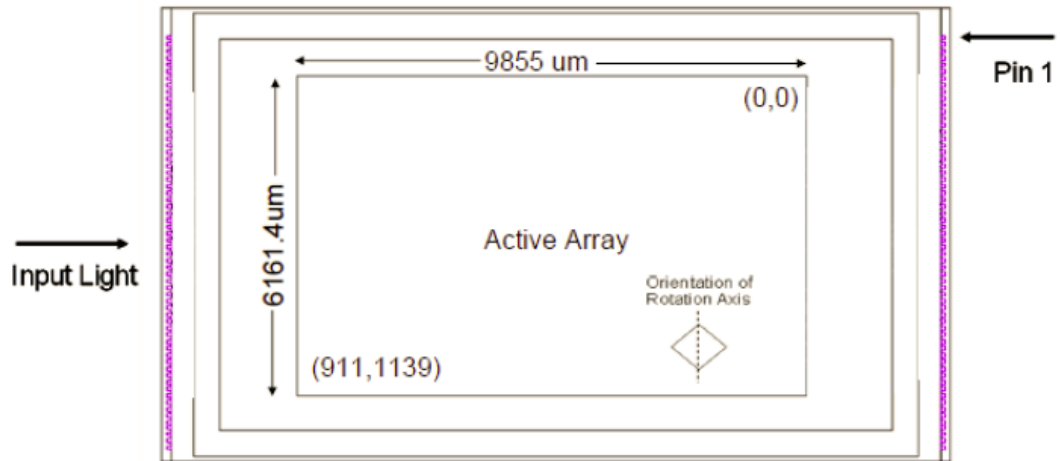
3.1.2 Valitun DMD:n valaisukoneisto

Valitsimme tässä työssä happianturiin integroitavaksi DMD:ksi DLP4500:n, erityisesti koska siinä oli suurempi kirkkaus, parempi kontrastisuhde ja parempi kirkkauden tasaisuus. Kuvassa 16 on esitetty DLP LightCrafter 4500 Evaluation Module (EVM), joka koostuu ohjauspiirikortista ja sen alla sijaitsevasta valaisukoneistosta. Ohjauspiirikortissa on ledien piirit, DLPC350 DMD -ohjain, tehonhallintapiirit, TFP401 DVI-RGB-muunnin ja 32 megabitin flash-muisti. Valaisukoneisto sisältää optisen laitteiston; punaisen, vihreän ja sinisen ledin; 0,45 WXGA DMD:n, jäähdytyslevyt ja tuulettimen. Laitteen käyttöoppaassa [35] kuvataan tarkemmin DLP LightCrafter 4500 EVM:n toiminta.



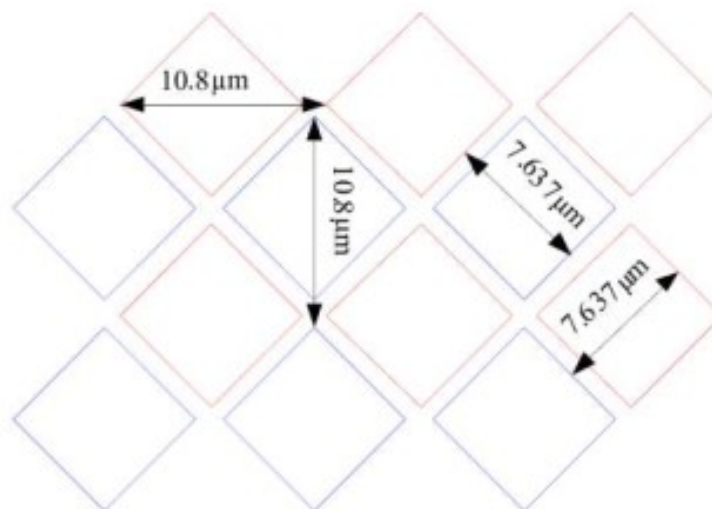
Kuva 16. *DLP LightCrafter 4500 Evaluation Module [35, s. 6]: ohjauspiirikortti (päällä) ja valaisukoneisto (alla).*

DLP LightCrafter 4500 EVM:n käyttämä DMD on DLP 0.45 WXGA DMD, joka on hahmoteltu kuvassa 17. Kyseisen DMD:n tarkempi rakenne ja toiminta löytyvät DMD:n datalehdeltä [32]. DMD:n lävistäjän pituus on lähes 0,45 tuumaa (1,14 cm), josta DLP4500 on saanut nimensä. Kuvassa 17 DMD:n vastakkaisilla reunoilla erottuvat pinnit väritettyinä, sekä DMD-sirun keskeltä ohjelmoitavissa olevien mikrobeilien alue, niin kutsuttu aktiivinen DMD-alue. Aktiiviset mikrobeilit on nimetty koordinaattiensa (X , Y) mukaan, jossa $X \in [0,911]$ kertoo missä kohtaa mikrobeiliriviä mikrobeili sijaitsee, ja $Y \in [0,1139]$ kertoo millä peilirivillä mikrobeili sijaitsee.



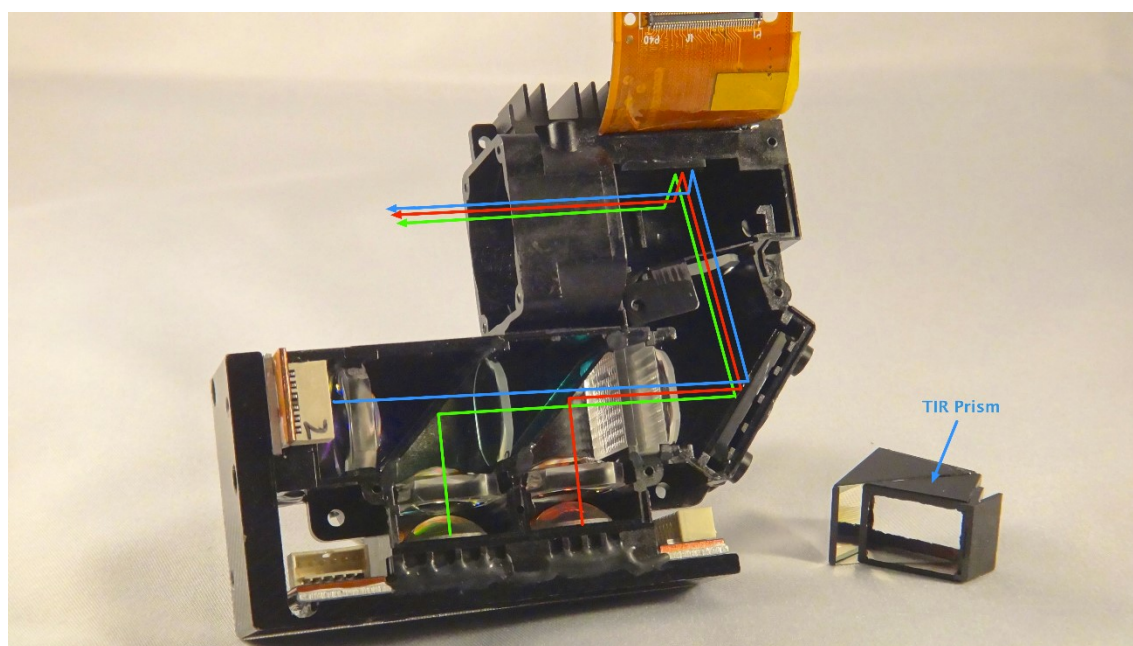
Kuva 17. Aktiivisen DMD:n mitat ja mikrobeilikoordinaatit. Mikrobeilit ovat asettuneet vinottaissuuntaisesti DMD:hen nähden. [32, s. 18]

Aktiivisella DMD-alueella on 1140 päällekkäistä mikrobeiliriviä. Kukin peilirivi koostuu 912 ohjelmoitavasta mikrobeilistä. Aktiivisen DMD-alueen leveyden suhde korkeuteen on kuitenkin 16:10. Tämä johtuu siitä, että mittasuhteiltaan neliömäiset mikrobeilit ovat järjestäytyneet DMD:lle vinottaissuuntaisesti muodostaen timanttikuvion. Tällöin vierekkäiset mikrobeilirivit sijaitsevat lomittain toisiinsa nähden. Kuvassa 18 on havainnollistettu mikrobeilien sijoittumista toisiinsa nähden. Neliömäisten mikrobeilien keskipisteiden etäisyys toisistaan on $7,637 \mu\text{m}$ peilien sivujen normaalien suuntaisesti eli diagonaalisesti DMD-alueeseen nähden. Mikrobeilien etäisyys peilien lävistäjien suuntaisesti eli poikittais- ja pitkittäissuuntaisesti DMD-alueeseen nähden on $10,8 \mu\text{m}$ keskipisteestä keskipisteeseen. Mikrobeiliriveillä vierekkäisten peilien etäisyys toisiinsa on siis $10,8 \mu\text{m}$ mikrobeilin keskipisteestä seuraavan peilin keskipisteeseen. Sen sijaan vasta joka toisen peilirivin mikrobeilit ovat keskipisteistään katsottuna $10,8 \mu\text{m}$:n etäisyydellä toisistaan.



Kuva 18. Mikrobeilien sijoittuminen ja etäisyydet DLP4500:llä. [35, s. 12]

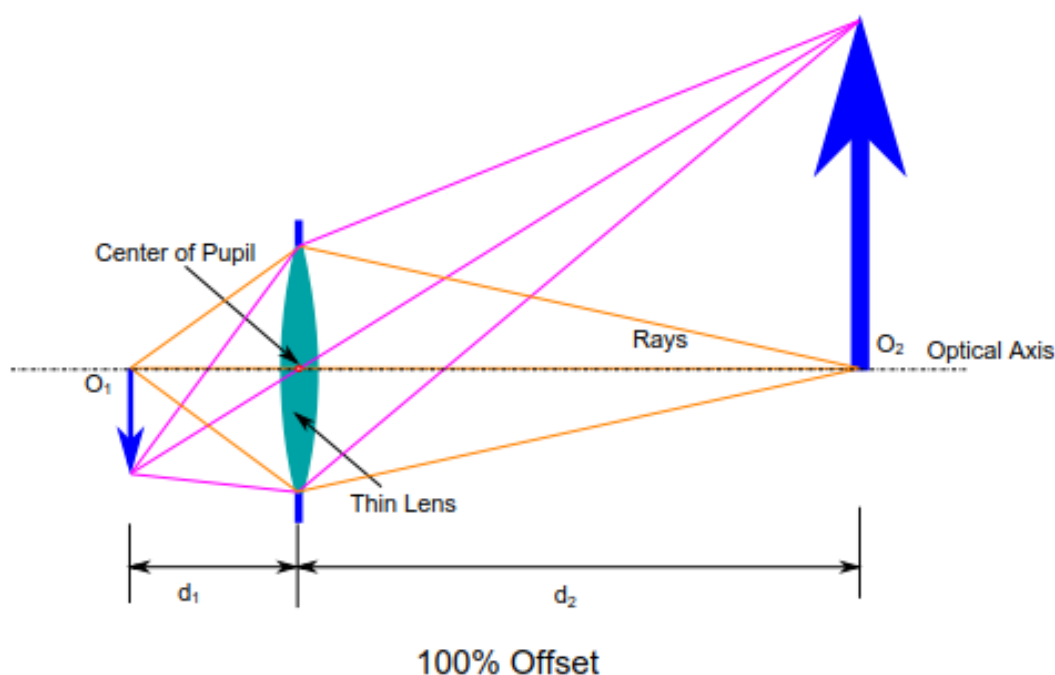
Kuvassa 19 on esitetty valon kulku DLP LightCrafter 4500 EVM:ssä kustakin ledistä lähtien. Videoprojektorista on irrotettu ohjauspiirikortti, jäähdytyslevyt, DMD:n jälkeinen fokusointioptiikka sekä DMD:n edessä sijaitseva kokonaisheijastumiseen perustuva prisma (TIR-prisma). TIR-prisma koostuu yleensä kahdesta prismasta, joiden välissä on noin $10\text{ }\mu\text{m}$ leveä ilmakerros. Kaikki valonsäteet, joiden tulokulma on pienempi kuin kriittinen kulma, joka on noin $41,2^\circ$ BK7-lasille, pääsevät läpi, kun taas loput valonsäteet heijastuvat.



Kuva 19. Valon kulku DLP LightCrafter 4500 EVM:ssä. [37]

Kunkin ledin edessä on kokoojalinssi kaventamassa ledistä saapuvaa valonsädekimppua. Dikromaattiset peilit heijastavat tiettyjä aallonpituuksia päästäten lävitseen loput. Kärpäsen silmä -linssisysteemi levittää valonsäteet spatiaalisen tasaisesti. Valonsäteet heijastuvat peilistä, menevät TIR-prismaan ja edelleen kuvan yläosassa sijaitsevaan DMD-siruun, josta ne heijastuvat takaisin TIR-prismaan. On-asentoisten peilien kautta heijastuvat valonsäteet pääsevät ulos videoprojektorista, kun taas off-asentoisten kautta heijastuvat valonsäteet kulkeutuvat lämpönieluun.

DLP LightCrafter 4500 EVM:n korkeussiirtymä on 100 %, eli kuvan 20 mukaisesti projektiokuva muodostuu videoprojektorin ulostulon optisen akselin yläpuolelle niin, että alin osa kuvasta korkeintaan koskettaa optista akselia. Videoprojektori on tarkoitettu projisoimaan kuva vaakatason yläpuolelle, kun videoprojektori on pöydällä. Ilman fokusointioptiikkaakin korkeussiirtymä on 100 %. Jos korkeussiirtymä halutaan muuttaa arvoon 0 %, fokusointioptiikka on vaihdettava. Radikaalimpi tapa korkeussiirtymän muuttamiseksi arvoon 0 % olisi irrottaa DMD-siru ja sen ohjausosat videoprojektorista, ja rakentaa oma optinen systeemi DMD:n ympärille. Kussakin tapauksessa DMD:n jälkeiset linssit ja linssien kiinnittimet eivät saisi heijastaa liikaa valoa takaisin DMD:hen aiheuttaen lämpötilan nousua DMD:ssä.



Kuva 20. 100 %:n korkeussiirtymä. [38, s. 8]

Fluoresenssisovelluksessa on järkevää pyrkiä mahdollisimman telesentriseen optiseen ratkaisuun. Tällöin kollimoitu eksitaatorintama säilyy kollimoituna myös optiikan jälkeen, eivätkä pienet muutokset optisessa matkassa linssijärjestelmän jälkeen aiheuta muutosta suurennussuhteessa. Valmiita telesentrisiä optisia ratkaisuja on tarjolla, mutta ne ovat kohtuullisen kalliita eikä niiden suurennussuhteen muuttaminen tyypillisesti ole mahdollista. Päädyimme rakentamaan yksinkertaisen, kahdesta linssistä ja niiden välisestä apertuurista koostuvan telesentrisen järjestelmän, jonka suurennussuhdetta voitiin muuttaa linssjä vaihtamalla.

3.1.3 Valitun DMD:n ohjaus

DMD:tä ohjattiin ilmaiseksi ladattavalla, TI:n kehittämällä ohjausohjelmistolla DLP LightCrafter 4500 Control Software (DLPLCR4500GUI). Aluksi tässä työssä käytettiin versiota 3.0.1. ja myöhemmin versiota 3.1.0. Ohjausohjelmisto yhdistettiin tietokoneesta videoprojektoriin USB-liitännän välityksellä.

Tässä työssä DMD:n peilien ohjaus suoritettiin videoprojektorin flash-muistiin tallennetuilla kuvilla. DLP LightCrafter 4500 EVM:n flash-muistiin voi tallentaa 64 24-bittistä värikuvaa, joista kukin muodostuu kahdeksasta vihreästä, kahdeksasta punaisesta ja kahdeksasta sinisestä binäärikuvasta. Binäärikuva on yksibittinen bittikartta, joka määrää DMD:n peilien asennot. Ohjausohjelmistolla binäärikuvia voi ohjelmoida flash-muistilta esitettäväksi rajoittamaton määrä peräkkäin, ja binäärikuvien välissä DMD:n peilit voi asettaa off-asentoon eli nollata. Jokaisen binäärikuvan esityksen ja off-tilan keston voi

määritellä erikseen. Binäärikuvasarjan voi myös asettaa toistuvaksi. Tässä työssä 1140×912-resoluution binäärikuvat tehtiin MATLAB-ohjelmistolla.

Binäärikuvassa bitin arvo 0 tarkoittaa off-asentoa ja 1 on-asentoa. Ohjausohjelmiston valinnoissa tämä asetus voidaan tarvittaessa kääntää päinvastaiseksi. Binäärikuvia voi vaihdella nopeasti, mutta rajoittavana tekijänä on vaihdeltavien binäärikuvien määrä: Jos kuvasarjassa tarvitsee käyttää yli 24:ää erilaista binäärikuvaa, binäärikuvat on tallennettava eri 24-bittisiin kuviin. Seuraavan binäärikuvan tallentaminen valmiiksi DLPC350:n sisäiseen muistiin saattaa kestää jopa 200 ms [35, s. 48]. Tässä työssä kyseinen rajoittava tekijä näkyi DMD:ltä heijastuneiden binäärikuvien katkonaisuudella ja hyppimisellä: kahden 24-bittisiin värikuviin tallennettujen vaaka- ja pystysuorien palkkikuvioden välillä vaihteleva aiheutti häiriötä jo 80 ms:n vaihteluajalla. Ohjausohjelmistolla on toiminto (*Image Load Timing*), jonka avulla kuvan lataukseen kuluva aika voidaan laskea.

Jos hapenmittauksen eksitaatiovalon pulssitus olisi toteutettu DMD:llä, se olisi rajoittunut 2 kHz:n taajuuteen. 2 kHz:n kanttiaalto olisi asetettu ohjausohjelmistolla määrittämällä *Sequence settings* välilehden alta *Timing*-kohdassa kuvion valotusajaksi (*Pattern exposure*) 250 μ s ja kuvion aikaväliksi (*Pattern Period*) 500 μ s. Tätä suurempaa taajuutta kanttiaallolle ei ole mahdollista toteuttaa DMD:llä, koska DLP LightCrafter 4500 EVM vaatii kuvion valotusajan ja aikavälin erotukseksi vähintään 230 μ s. Tässä työssä eksitaatiovalon pulssitus tehtiin kuitenkin ledillä.

DLP LightCrafter 4500 EVM:n valonlähteenä voidaan käyttää joko vihreää, punaista tai sinistä lediä tai niiden kombinaatiota. Ohjausohjelmistossa voidaan valita on-asennon heijastamaksi valoksi siis vihreä, punainen, sininen, keltainen, magenta, syaani tai valkoinen. Vihreä valo vahingoittaa soluja vähemmän kuin sininen valo, mutta enemmän kuin punainen valo [30]. Fluoroforin eksitaatio- ja emissiokaista määräävät happipitoisuuden mittauksessa käytettävän ledin. Tässä työssä käytettiin fluoroforia PtTFPP ja happianturin valonlähteenä vihreää valoa.

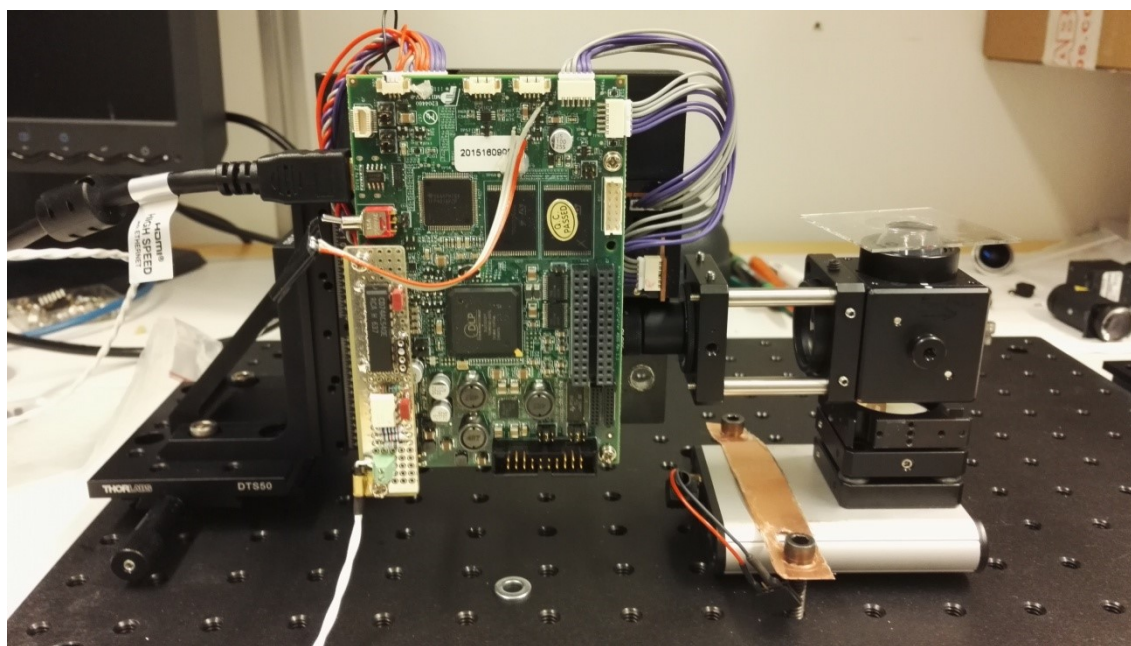
3.2 DMD:n integrointi happianturiin

Fluoresenssiemission vaihe-eromittaus haluttiin toteuttaa 2 kHz:n taajuudella. Tällä taajuudella vaihe-eron θ arvo muuttuu selvästi ja lähes lineaarisesti happipitoisuuden vaihtelun mukaan käytettäessä PtTFPP:tä fluoroforina [25, s. 142]. Vaihe-ero saa maksimiarvonsa hapettomissa olosuhteissa, joissa PtTFPP:n emission elinaika on 50 μ s, ja pienenee happipitoisuuden kasvaessa.

Yksinkertaisuuden ja selvyuden vuoksi eksitaatiovalon pulssittaminen päätettiin tehdä jo valonlähteellä. Toisinkuin jos valonlähteenä käytettäisiin kaarilamppua, LED tai laser voidaan nopeasti sammuttaa ja laittaa päälle halutun (tässä työssä 2 kHz:n) taajuuden tahtiin. Tällöin DMD:n ohjaukseen ei tarvitse enää lisätä kaikkien peilien säännöllistä sul-

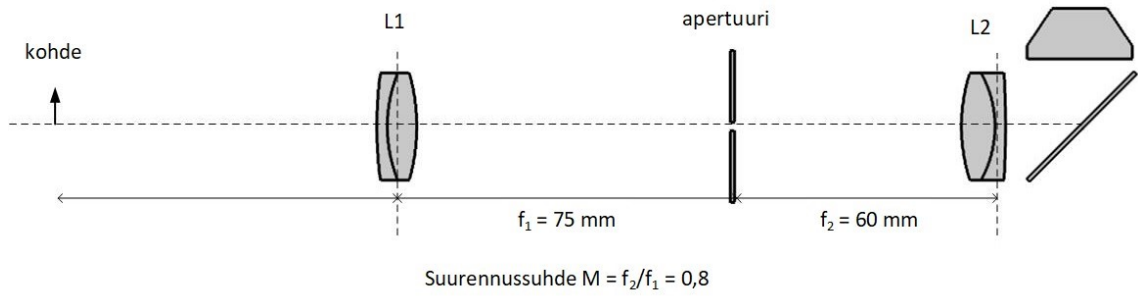
kemista, vaan DMD:n ohjauksessa keskitytään vain halutun valokuvion luomiseen. Lisäksi vältetään turhalta lämmöntuotolta laitteistoon, kun valonlähde ei ole koko ajan päällä.

DLP LightCrafter 4500 EVM:ään lisättiin ulkoinen LED-ajuri. Kuvassa 21 näkyy lisätty ulkoinen LED-ajuri ja elektroniikka: lisäkortti videoheittimen ohjauspiirikortin päällä, lisäkortin liittimet sekä jumpperi J30 sillattuna. Lisäkortti yhdistettiin vihreän ledin syöttöliittimeen ja ulkoiseen LED-ajuriin. Ulkoinen LED-ajuri ohitti videoprojektorin ohjausohjelmiston ledien ohjauksen, mutta ohjausohjelmistolla pystyi vielä valitsemaan vihreän ledin kirkkauden. Ulkoisen LED-ajurin pystyi poistamaan videoheittimestä irrottamalla vihreän ledin syöttöliittimen lisäkortista ja avaamalla jumpperin J30.



Kuva 21. Videoprojektoriin lisätty ulkoinen LED-ajuri ja sen elektroniikka. Ulkoinen LED-ajuri on hopean kotelon sisällä (kuvassa alhaalla oikealla kiinnitettynä alustaan). Hopenvärisestä lisäkortista (kuvan ohjauspiirikortin vasemmassa reunassa) lähtee ulkoiseen LED-ajuriin kiinnitettävä valkoinen johdin. Vihreän ledin punavalkoisen värinen syöttöliitin ei ole kiinnitettynä lisäkorttiin.

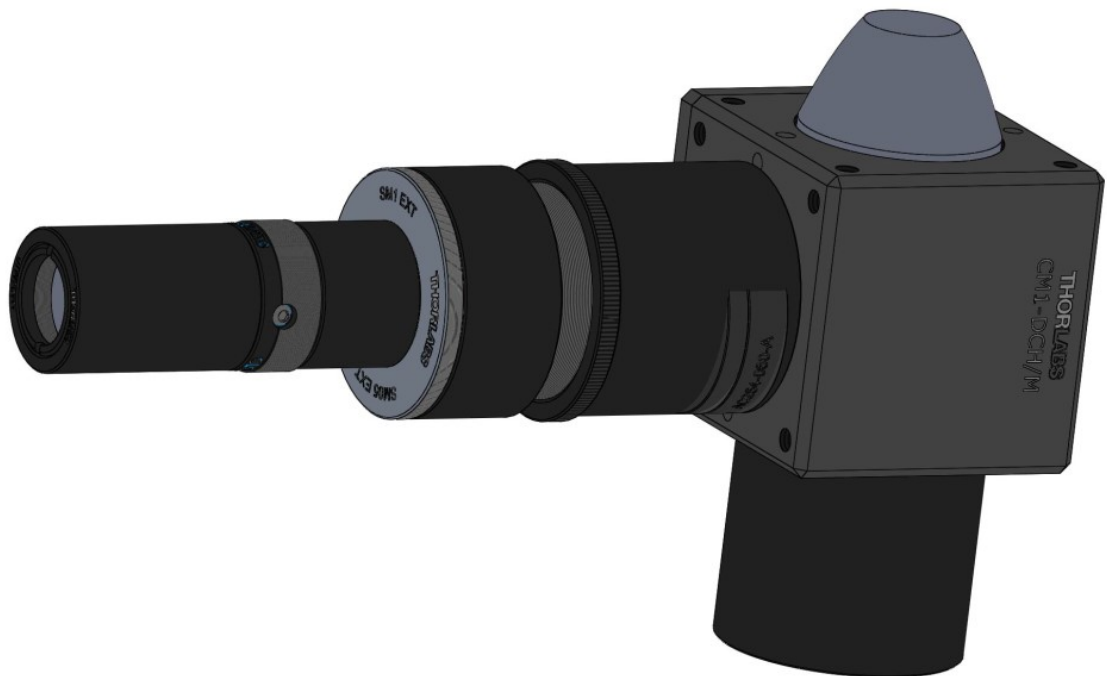
DMD:stä hapenmittauslaitteeseen heijastuvan valon vaatimuksena oli olla mahdollisimman kollimoitua eli samansuuntaista. Hapenmittauslaitteeseen saapuvan valon intensiteetin haluttiin olevan myös mahdollisimman tasaisesti jakautunut poikkipinta-alaansa nähden. Lisäksi videoprojektorin jälkeisen optiikan haluttiin pienentävän DMD:ltä saapuva kuva. DLP LightCrafter 4500 EVM:n irrotettavan fokusointioptiikan tilalle rakennettiin kahdesta linssistä ja säädettävästä apertuurista koostuva telesentrinen optinen systeemi. Kuvassa 22 on esitetty rakennetun optiikan kaaviokuva, jonka suurennus on arvoltaan 0,8.



Kuva 22. Kaaviokuva käytetystä telesentrisestä optisesta systeemistä.

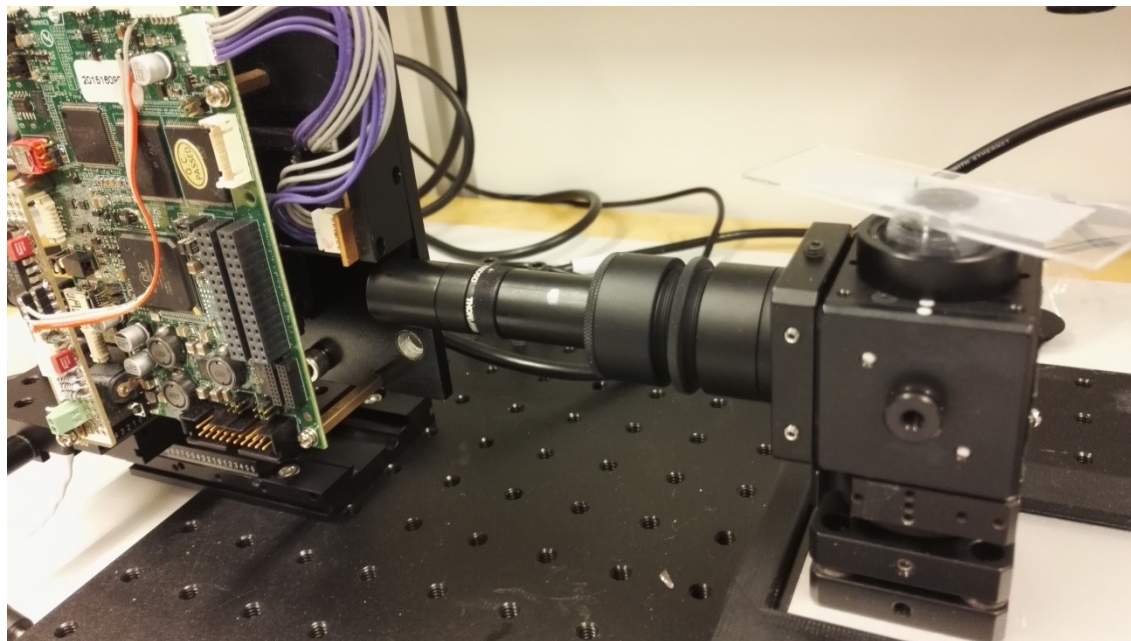
Polymeerikalvolle saapuvan valon haluttiin olevan suodatettu. Linseillä on väripoikkeamaa ja pallopoikkeamaa. Mitä leveämpi eksitaatiovalon aallonpituusalue on, sitä enemmän linssien väripoikkeama aiheuttaa kohdistusvirhettä. Kun valo osuu vain pienelle alueelle linssijä, aiheutuu linssien pallopoikkeamasta vain vähän kohdistusvirhettä. Uuden optiikan himmentimen (SM05D5D, Thorlabs) halkaisija eli apertuuri oli säädettävissä 0,07–5,0 mm:n asteikolla.

Kuvassa 23 on esitetty Solidworks-ohjelmistolla piirretty kokoonpano uudesta optiikasta: Eksitaatiovalo saapuu DMD:ltä TIR-prisman kautta ja menee sisään kuvan 23 vasemmasta päästä optiikkaa. Dikromaattisesta peilistä eksitaatiovalo heijastuu ylös paraboloidiseen linssiin, jonka yläpää on leikattu tasaiseksi. Emissiovalo kulkee alas paraboloidisen linssin, dikromaattisen peilin ja linssien läpi.



Kuva 23. Videoprojektorin jälkeinen optiikka. Vasemmalta saapuva eksitaatiovalo menee linssien ja säädettävän himmentimen kautta dikromaattisen peilin sisältävään kuutioon. Eksitaatiovalo ohjautuu kuutiosta ylös paraboloidiseen linssiin ja emissiovalo alas.

Rakennetun hapenmittauslaitteiston luotettavuutta ja soveltuvuutta testattiin eri mittauksin. Kuvassa 24 on kuvattu osa hapenmittauslaitteistosta. Paraboloidisen linssin yläpuolella oli lasinen näytelevy.



Kuva 24. Hapenmittauslaitteisto, jolla tehtiin testimittaukset.

3.3 Happianturin paikkakalibrointi mikroskooppikuvaan

Happianturilla on tarkoitus mitata vain määriteltyjen alueiden hapenvaihtelua, ja jättää muut alueet virittämättä eksitaatiovalolla. Tätä varten DMD:ltä on valittava vain tietyt mikrokeilit, jotka heijastavat eksitaatiovalon solunkasvatusaltaan pohjalla sijaitsevalle fluoresoivalle polymeerikalvolle. Mikroskoopin kameralla otetaan kuva soluista ja kuvasta valitaan viritysalueet. Määriteltyjen viritysalueiden sijaintikoordinaatit mikroskooppikuvassa muutetaan DMD:n mikrokeilikoordinaateiksi. Jotta koordinaattimuutos voidaan tehdä, on ensin suoritettava paikkakalibrointi, jolla selvitetään mihin kohtaan mikroskooppikuvassa mikäänkin DMD:n mikrokeili heijastaa eksitaatiovalon. Mikroskoopin ja happianturin sijainti ja asento eivät välttämättä pysy vakioina mittausten välillä: mikroskooppi voi paikalleen kiinnitettyynkin happianturiin nähden siirtyä poikittais-, pitkittäis- ja korkeussuunnassa sekä kiertyä poikittais-, pitkittäis- ja korkeusakselin ympäri. Lisäksi mikroskoopin objektiivi voi vaihtua muuttaen suurennusta. Siksi mikroskooppikuvan ja DMD-kuvan välinen suhde on selvitettävä ennen mittauksen aloittamista.

Tässä työssä eksitaatiovalo saapui happianturista näytteelle kohtisuorasti. Mikroskoopin kulkeutuva eksitaatiovalo on intensiteetiltään paljon suurempi kuin polymeerikalvon fluoresoivasta aineesta emittoituva valo, joten paikkakalibroinnissa mikroskooppi kuvaa suurimmaksi osaksi näytteestä saapuvaa eksitaatiovaloa.

Paikkakalibroinnissa voidaan käyttää suoraan mitattavaa solukasvatusmaljaa. Tällöin kuitenkin solut joutuvat turhaan rasitukseen, jos paikkakalibrointi kestää kauan, tai jos solut altistuvat kalibroinnin aikana suurelle valomäärälle. Toinen vaihtoehto olisi suorittaa paikkakalibrointi erillisellä, happianturin ja mikroskoopin väliin asetettavalla kalibroitinäytteellä, kuten soluttomalla solukasvatusmaljalla. Paikkakalibrointi erillisellä näytteellä on mahdollista, jos paikkakalibroinnin ja mikroskooppikuvan ottamisen välisenä aikana mikroskoopin ja happianturin välinen sijainti ja mikroskoopin suurennus eivät muutu, tai jos muuttuvat, niin muutosten suuruudet pystytään selvittämään. Paikkakalibroitaessa erillisellä näytteellä kalibroitinäytteen ja mittausräätin kallistuskulmissa ei saisi myöskään olla eroja.

3.3.1 Paikkakalibroinnin toteutuksen pohdinta

Tarkastellaan yhden DMD:n on-asennossa olevan mikrobeilin aiheuttamaa vastetta mikroskooppikuvassa: Mikroskoopin ja happianturin korkeussuuntaisen etäisyyden pieneneminen sekä mikroskoopin suurennuksen kasvattaminen lisäävät kameran pikselien määrää, johon valo osuu. Mikroskoopin siirtyminen poikittaistasossa muuttaa aktivoituvien pikselien sijaintia mikroskooppikuvassa vastakkaiseen suuntaan. Mikroskoopin pyöriminen korkeusakselinsa ympäri muuttaa aktivoituvien pikselien paikkaa mikroskooppikuvassa säilyttäen kuitenkin saman etäisyyden pikselien ja kiertoakselinsa välillä. Mikroskoopin kallistuminen pitkittäis- ja poikittaissuuntaan näkyy aktivoituvien pikselien sijainnin siirtymisenä vastakkaiseen suuntaan. Lisäksi tällaisessa tapauksessa eri mikrobeilit aktivoivat mikroskooppikuvassa eri määrän pikseleitä; aktivoituvien pikselien määrä kasvaa lineaarisesti kallistussuuntaan. Vielä lisäksi eri mikrobeilien aiheuttamien mikroskooppipikselivasteiden etäisyys toisistaan pienenee kallistussuuntaan.

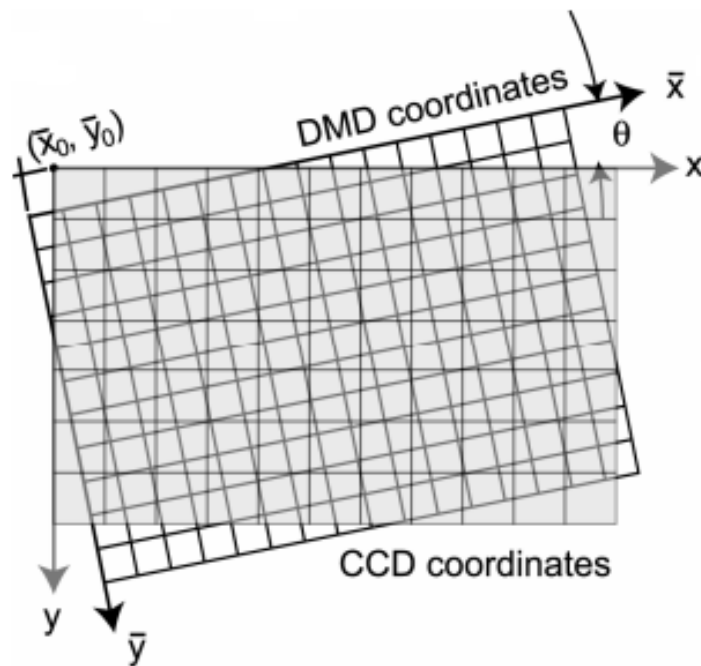
On-asentoisen mikrobeilin aiheuttaman vasteen sijainti mikroskooppikuvan koordinaatistossa voidaan määrittää aktivoituvien pikselien intensiteettien painotettuna keskiarvona. Yhdellä on-asentoisella mikrobeilillä voidaan määrittää DMD-kuvan keskipisteen ja mikroskooppikuvan keskipisteen vastaavuudet. Kahdella on-asentoisella mikrobeilillä voidaan selvittää DMD-kuvan koordinaatiston ja mikroskooppikuvan koordinaatiston välinen suurennus ja kiertymä. Kolmella on-asentoisella mikrobeilillä voidaan määrittää koordinaatistojen tasojen välisen kallistuman suuruus ja viidellä on-asentoisella mikrobeilillä kallistuman suunta.

Paikkakalibrointi päätettiin suorittaa kuvaamalla mikroskoopilla viiden on-asentoisen mikrobeilin aiheuttamat vasteet yksi kerrallaan. Kalibroinnissa käytetyt mikrobeilit nimettiin keskimmäiseksi, oikeaksi, ylimmäksi, vasemmaksi ja alimmaksi kalibrointiherätteeksi. Ensimmäinen on-asentoisista mikrobeileistä sijaitsi suurin piirtein keskellä DMD:tä mikrobeilikoordinaateissa (456, 570). Toinen on-asentoisista mikrobeileistä sijaitsi puolella välissä keskipistettä ja DMD:n oikeaa laitaa mikrobeilikoordinaateissa (228, 570), noin $228 \cdot 10,8 \mu\text{m} = 2462,4 \mu\text{m}$:n etäisyydellä DMD:n keskipisteestä. Kolmas sijaitsi puolella välissä keskipistettä ja DMD:n ylälaitaa mikrobeilikoordinaateissa (456,

285), noin $285 \cdot 10,8 \mu\text{m} / 2 = 1539 \mu\text{m}$:n etäisyydellä DMD:n keskipisteestä. Neljäs kalibroinnissa käytetty mikrobeili sijaitsi yhtä kaukana, mutta vastakkaisella puolella keskipistettä kuin toisena käytetty mikrobeili, mikrobeilikoordinaateissa (684, 570), ja viides vastaavasti vastakkaisella puolella kolmanteen nähden, mikrobeilikoordinaateissa (456, 855).

3.3.2 Kirjallisuudessa käytetty paikkakalibrointimenetelmä

Kirjallisuudessa [24] paikkakalibrointi toteutettiin määrittelemällä kiertokulma θ ($^\circ$), suurenus M ja keskipisteiden sijaintiero (\bar{x}_0, \bar{y}_0) DMD-kuvan ja kamerakuvan karteesisen koordinaatistojen välillä. Koordinaatistojen oletettiin sijaitsevan samassa tasossa ja optisen vääristymän olevan merkityksettömän pieni. Kuvassa 25 on esitetty DMD-kuvan $\bar{x}\bar{y}$ -koordinaatisto ja kamerakuvan xy -koordinaatisto päällekkäin. DMD:n mikrobeilien ja kamerakuvan pikselien keskipisteet sijaitsevat koordinaatistojen pisteissä. Vierekkäisten pisteiden etäisyydet ovat erisuuret eri koordinaatistoissa suurennuksen verran. Koordinaatistot ovat vinottain toisiinsa nähden kiertokulman verran. Koordinaatistojen origot (koordinaattiakselien leikkauspisteet) ovat erillään toisistaan keskipisteiden sijaintieron verran.



Kuva 25. DMD-kuvan ja kamerakuvan koordinaatistot. [24]

Koordinaatistojen välinen suhde kuvattiin kaavalla

$$\begin{bmatrix} x \\ y \end{bmatrix} = M \begin{bmatrix} \cos \theta & -\sin \theta \\ \sin \theta & \cos \theta \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \bar{x} - \bar{x}_0 \\ \bar{y} - \bar{y}_0 \end{bmatrix} \quad (3)$$

Kiertokulma määritettiin vertaamalla DMD-kuvassa olevan vaakasuoran suoran ja sen kamerakuvavasteeseen aikaansaaman suoran välinen kulma. Keskipisteiden sijaintiero määritettiin lisäämällä pystysuora suora DMD-kuvaan, ja määrittämällä suorien leikkauskohdat keskipisteiksi. Suurenus määritettiin vertaamalla kahden 64×64 on-asentoisen mikrojeilin muodostaman neliön kokoeroa DMD-kuvassa ja sen synnyttämässä kamera-kuvassa.

3.3.3 Paikkakalibroinnin toteutus

Paikkakalibrointi aloitettiin tarkentamalla kamera kuvaamaan kalibroitinäytettä. Sitten viiden kalibrointiherätteen aikaansaamat vasteet tallennettiin kamerakuvin. Lopuksi kalibroidata analysoitiin MATLAB-ohjelmistolla. Kustakin vastekuvasta etsittiin pikseli, jolta oli mitattu suurin intensiteetti. Kyseinen pikseli vastasi näytteessä sitä sijaintia, joka vastaanotti suurimman valomäärän kyseisen mikrojeilin ollessa on-asennossa. Vastepisteiden avulla määritettiin DMD-koordinaatiston ja kuva-koordinaatiston välinen kiertymä ja suurenus. Yksinkertaisuuden vuoksi DMD-tason ja kamerasen kennotason normaalien oletettiin olevan yhdensuuntaisia. Oletuksen mukaan mikroskoopin ja happianturin välillä ei ole kallistumaa, joten kalibroidatasta ei tarvinnut määrittää koordinaatistotasojen välistä kallistumaa.

Paikkakalibroinnin perusteella voitiin selvittää, minkä kuvapikselin kohdalle mikäkin mikrojeili heijasti suurimman osan valosta. Koordinaatistomuunnos suoritettiin muuttamalla kuvapikselin koordinaatit (x, y) karteesisesta koordinaatistosta napakoordinaatistoon, jotka sitten muutettiin DMD-koordinaatistoon napakoordinaateiksi, ja lopulta DMD-koordinaatiston karteesisiksi koordinaateiksi (X, Y) . Koordinaatistomuunnos toiseen suuntaan, mikrojeilistä pikseliksi, suoritettiin samojen välivaiheiden kautta vastakkaisessa järjestyksessä. Lopullisen mikrojeilin tai pikselin sijainti saatiin pyöristämällä koordinaatit tasaluvuiksi.

Paikkakalibroinnin jälkeen mikroskooppikuvasta voitiin valita näytealueet, joihin haluttiin lähettää eksitaatiovalo. Valitut pikselisijainnit muutettiin koordinaatistomuunnoksella kyseisten alueiden eksitoimiseksi tarvittavien mikrojeilien sijainneiksi. Koordinaatistomuunnos oli tehtävä paikkakalibroinnin yhteydessä, tai heti sen jälkeen otetusta mikroskooppikuvasta, kunhan mikroskooppia ei liikutettu tai mikroskoopin suurennusta muutettu paikkakalibroinnin jälkeen.

3.3.4 Paikkakalibroinnin toimivuuden testaus

Koordinaatistomuunnoksessa kuvan yksittäiselle pikselille määritettiin siinä suurimman vasteen aikaansaava on-asentoisen mikrojeili. Koordinaatistomuunnoksen tarkkuus riippui paikkakalibrointimittauksen tarkkuudesta. Mikroskooppikuva oli onnistunut, kun valotusaika ja muut asetukset mahdollistivat pikselien intensiteettierottelun kalibroitivasteessa.

Paikkakalibroinnin jälkeen kalibroinnin onnistumista testattiin valitsemalla eksitoitavat alueet kamerakuvasta, muuttamalla valitut kamerakoordinaatit koordinaatistomuunnoksella DMD-koordinaateiksi, lähettämällä DMD-koordinaatteja vastaava valokuvio näytteeseen, ja vertaamalla näytteestä otettua kamerakuvaa alkuperäiseen valokuvioon. Onnistuneessa paikkakalibroinnissa odotettiin valittujen eksitaatioalueiden ja niiden aikaansaaman vasteen olevan toisiaan vastaavat.

3.4 Fluoresenssilaitteiston testaus

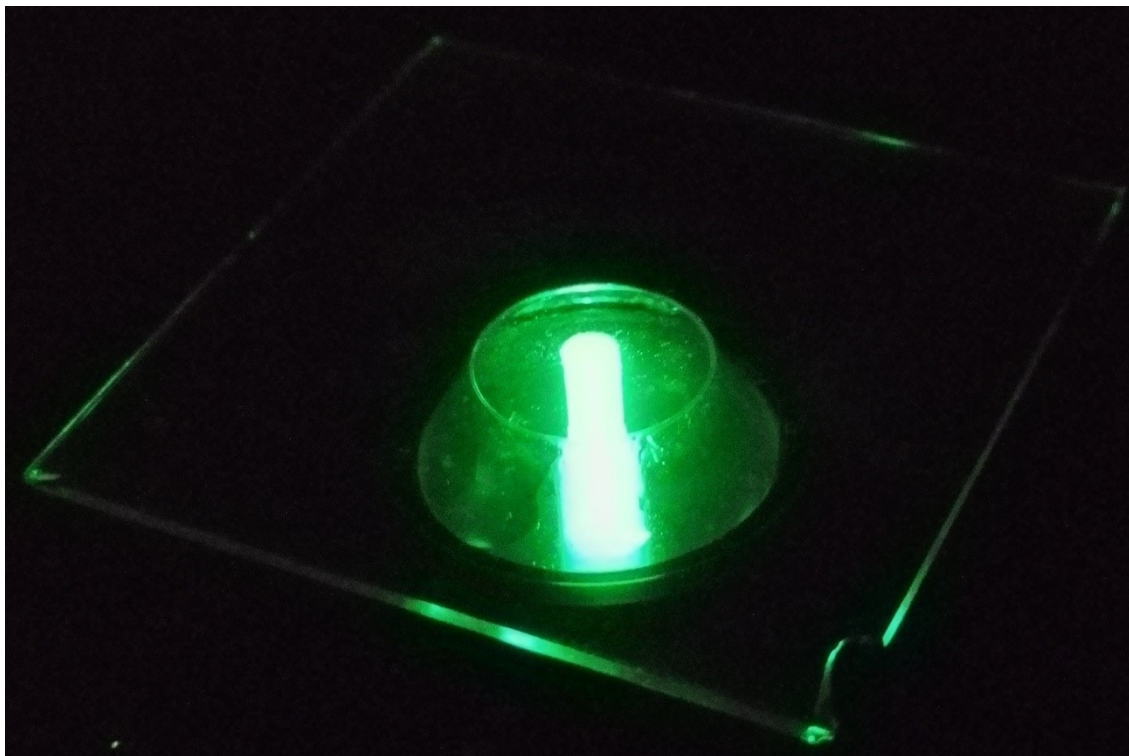
3.4.1 Ledien spektrit

DLP LightCrafter 4500 EVM:n ledien emissiospektrit mitattiin videoprojektorin ulostulosta spektrometrillä (Ocean Optics Inc, JAZ Spectrometer). Mitattuja emissiospektrejä verrattiin ledien valmistajan antamiin emissiospektreihin ja työssä käytetyn fluoroforin eksitaatio- ja emissiokaistaan. Sopivan valonlähteen emissiospektrin haluttiin osuvan mahdollisimman hyvin fluoroforin eksitaatiokaistoille ja olevan kaukana fluoroforin emissiokaistoista.

Ledien emissiospektrien perusteella valittiin fluoresenssimittauksissa käytetty ledi. Ledin emissiospektri vaikutti myös fluoresenssilaitteiston suodattimien valintaan.

3.4.2 Fluoresenssimittauksen suorituskyvyn määrittäminen

Fluoresenssilaitteiston suorituskykyä tarkasteltiin mittaamalla vaihe-eron sekä emissiovalon intensiteetin suhdetta eksitaatioalueen pinta-alaan. Koejärjestelyssä fluorofori-polymeerikalvoa eksitoiva alue muodostui ympyrästä, jonka keskipiste oli paraboloidisen linssin keskustan kohdalla, kuten kuvassa 26 näkyy. Ympyränmuotoista eksitaatiopinta-alaa kasvatettiin asteittain ympyrän sädettä kasvattamalla. Fluoresenssin vaihe-eron kuului pysyä vakiona, kun näytteen ympäristön happipitoisuus pysyy vakiona. Fluoresenssimittaukset suoritettiin 21 %:n ja 0 %:n happipitoisuuksissa. Fluoresenssimittaukset tehtiin ledin kahdella eri intensiteetillä.



Kuva 26. Ympyränmuotoinen vihreä eksitaatiovalo saapuu näytteelle paraboloidisen linssin keskustaa pitkin.

Mittauksia tehtiin uuden optiikan suurennusarvolla 0,8. Lisäksi mittauksia tehtiin optiikalla, jonka suurennuksen arvo oli 2,4. Himmennin oli täysin auki (5,0 mm), lähes kiinni (0,1 mm), tai vakioarvossa niiden väliltä. Vihreän ledin valaisutehona käytettiin asteikolla 0–255 arvoja 150 ja 255. Eksitaatio toteutettiin 2000 Hz:n taajuisella kanttiaallolla. Mittaukset suoritettiin, kun mikrobeilejä oli on-asennossa 0–161 025. Tätä suuremmaksi ympyränmuotoista eksitaatioaluetta ei voitu suurennuksen arvolla 2,4 kasvattaa, koska on-asentoiset mikropeilit saavuttivat DMD:n reunan. Kukin mittaus kesti yksi tai kaksi minuuttia. Fluoresenssin intensiteettiä ja vaihe-eroa mitattiin 10 Hz taajuudella. Intensiteetistä ja vaihe-erosta laskettiin keskiarvo ja keskihajonta 40–60 sekunnin ajalta.

Paraboloidisen linssin päälle asetettiin näytelevy, joka koostui 1 mm:n paksuisesta lasista ja sen päälle valmistetusta fluorofoori-polymeerikalvosta. Polymeerikerros oli noin 500 nm:n paksuista polystyreiniä, johon oli sekoitettu 3,0 massa-% PtTFPP:tä. Mittauksia tehtiin myös 1,0 massa-%:n PtTFPP-pitoisella polymeerikalvolla. Eksitaatiovalo fokusoiitiin polymeerinäytteeseen. Mittaukset tehtiin huoneenlämmössä, normaalissa ilmanpaineessa ja mahdollisimman pimeässä.

Polymeerikerroksen yläpuolella oli joko normaali happista ilmaa, jonka happipitoisuus oli 21 %, tai polymeerikerroksen päälle pipetoitiin koko eksitaatiovalon valaisualueelle 1 massa-%:n pitoista natriumsulfiitin (Na_2SO_3) vesiliuosta. Natriumsulfiitti poistaa kaiken hapen vedestä ja vähentää näin happipitoisuuden nolnaan prosenttiin fluorofoori-polymeerimatriisissa.

Eksitaatioalueen pinta-alan kasvaessa emissiovalon intensiteetin odotettiin kasvavan ja vaihe-eron pysyvän vakiona. Tulosten odotettiin olevan eriarvoiset happipitoisuuksissa 21 % ja 0 %. Samalla tarkasteltiin ledin intensiteetin, himmentimen, optisen suurennuksen sekä polymeerikerroksen fluoroforipitoisuuden vaikutusta vaihe-eron luotettavuuteen.

3.4.3 Fluoresenssi-ilmaisun paikkariippuvuuden määrittäminen

Samalla laitteistolla tarkasteltiin myös vaihe-eron ja fluoresenssin emissiovalon intensiteetin riippuvuutta eksitaatiovalon sijainnista. Mittauksia jatkettiin nyt pelkästään uuden optiikan suurennusarvolla 0,8. Ledin intensiteetti oli maksimiarvossaan ja himmennin oli lähellä minimiään. Ympyrän sijaan käytettiin muodoltaan neliömäistä, $276\text{ }\mu\text{m} \times 276\text{ }\mu\text{m}$ kokoista eksitaatioaluetta, jota siirrettiin asteittain, puolen neliön sivun pituisin askelein, etäämmälle paraboloidisen linssin keskipisteestä. Mittaukset suoritettiin neljään eri suuntaan paraboloidisen linssin keskipisteestä. Kukin mittaus kesti 60 s, josta ensimmäinen 5 s jätettiin pois analysoitaessa vaihe-eroa ja emissiosignaalin intensiteettiä. Mittaukset myös toistettiin, kun fluorofori-polymeerinäytelevyn paikkaa oli siirretty paraboloidisen linssin päällä, sekä kun eksitaatioalueiden päälle oli lisätty Na_2SO_3 -vesiliuosta poistamaan happi näytteen ympäristöstä.

Eksitaatiovalon siirtymisen kauemmaksi paraboloidisen linssin keskipisteestä voi odottaa pienentävän emissiovalon intensiteettiä, mutta vaihe-eron pysyvän kohtuullisen stabiilina. Tulosten odotettiin olevan eriarvoiset happipitoisuuksissa 21 % ja 0 %.

3.4.4 Fluoresenssilaitteiston skannauskyky

Hapenmittauslaitteiston erottelutehokkuutta tarkasteltiin sijoittamalla polymeerikerroksen yläpuolelle hapellisia ja hapettomia alueita. Alueet skannattiin kohdistamalla eksitaatiovalo vuorollaan kullekin alueelle ja mittamaalla alueelta fluoresenssin vaihe-ero. Mittausten tarkoituksena oli selvittää, kuinka luotettavasti mittauslaitteisto erotti hapellisen ja hapettoman alueen toisistaan.

Koko skannausalueen keskipiste pyrittiin asettamaan paraboloidisen linssin keskipisteen kohdalle. Koko skannausalue jaettiin $250\text{ }\mu\text{m} \times 250\text{ }\mu\text{m}$ kokoisiin neliöihin, joita kutakin skannattiin eksitaatiovalolla 3 sekunnin ajan. Kunkin skannausneliön mitatuista emissiointensiteetin ja fluoresenssin vaihe-eron arvoista määritettiin keskiarvo ja keskihajonta 2 sekunnin ajalta.

Himmennin pidettiin vakioarvossa ja ledin intensiteetti maksimiarvossa. Mittaukset suoritettiin kolmessa eri tapauksessa: kun koko skannausalue oli 21 %:n happipitoisuudessa, kun koko skannausalue oli 1 massa-%:n pitoisen Na_2SO_3 -vesiliuoksen alla 0 %:n happipitoisuudessa, ja kun skannausalueelle oli asetettu pisara Na_2SO_3 -vesiliuosta, jolloin joillakin skannausneliöillä happipitoisuus saattoi olla sekä 0 %:ssa että 21 %:ssa. Mittausten

ajaksi näytelevylle päälle asetettiin korkki ja sen sisälle vesipisara hidastamaan Na_2SO_3 -vesiliuospisaran haihtumista.

3.4.5 Eksitaatiovalon resoluutio

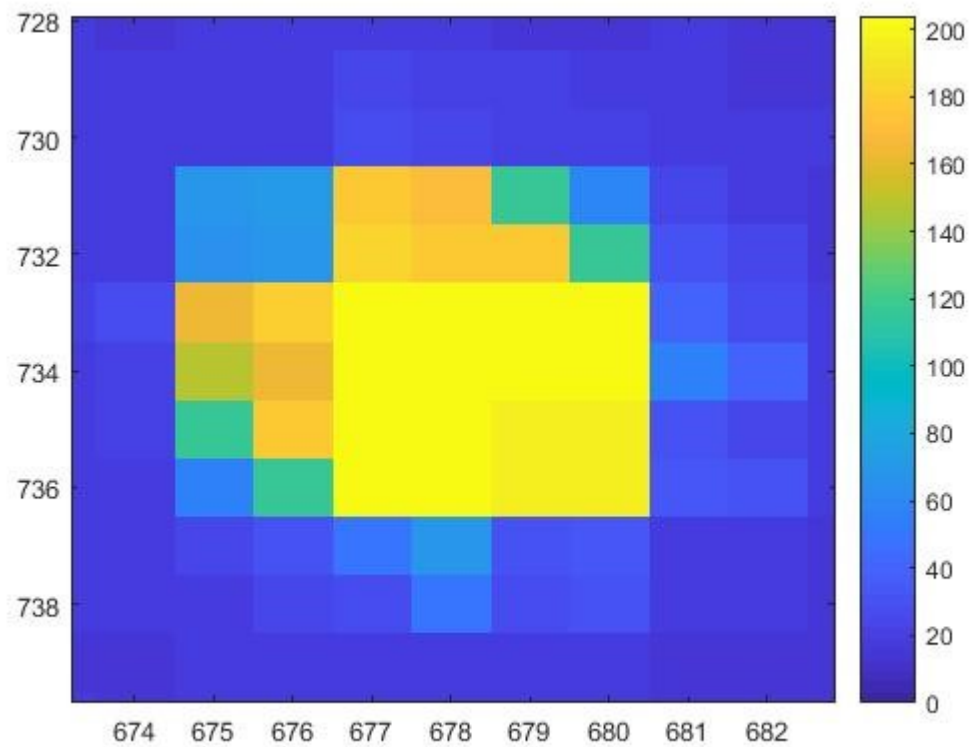
Eksitaatiovalon resoluutiota tarkasteltiin valaisemalla eksitaatioaluetta eri paksuisilla viivarivistöillä. Yksittäinen viivarivistö koostui paikallaan pysyvistä, vuorottelevista, yhtä leveistä kaistaleista, jotka oli luotu joko kauttaaltaan on-asentoisilla tai off-asentoisilla mikropileillä. Viivojen paksuutta vaihtelemalla tutkittiin, kuinka lähelle resoluutioviivat voitiin tuoda toisiaan, ennen kuin ne sulautuivat toisiinsa.

Resoluutioviivat suunnattiin näytteeseen, ja näytettä tarkasteltiin yläpuolella sijaitsevalla kameralla. Mittauksia tehtiin, kun näytteenä toimi joko pelkkä lasi, diffuuseri, lasin päällä oleva paperi tai lasin päällä oleva teippi. Myös himmentimen vaikutusta tutkittiin suorittamalla mittauksia eri himmenninaukon leveyksillä.

4. TULOKSET

4.1 Paikkakalibroinnin testaus

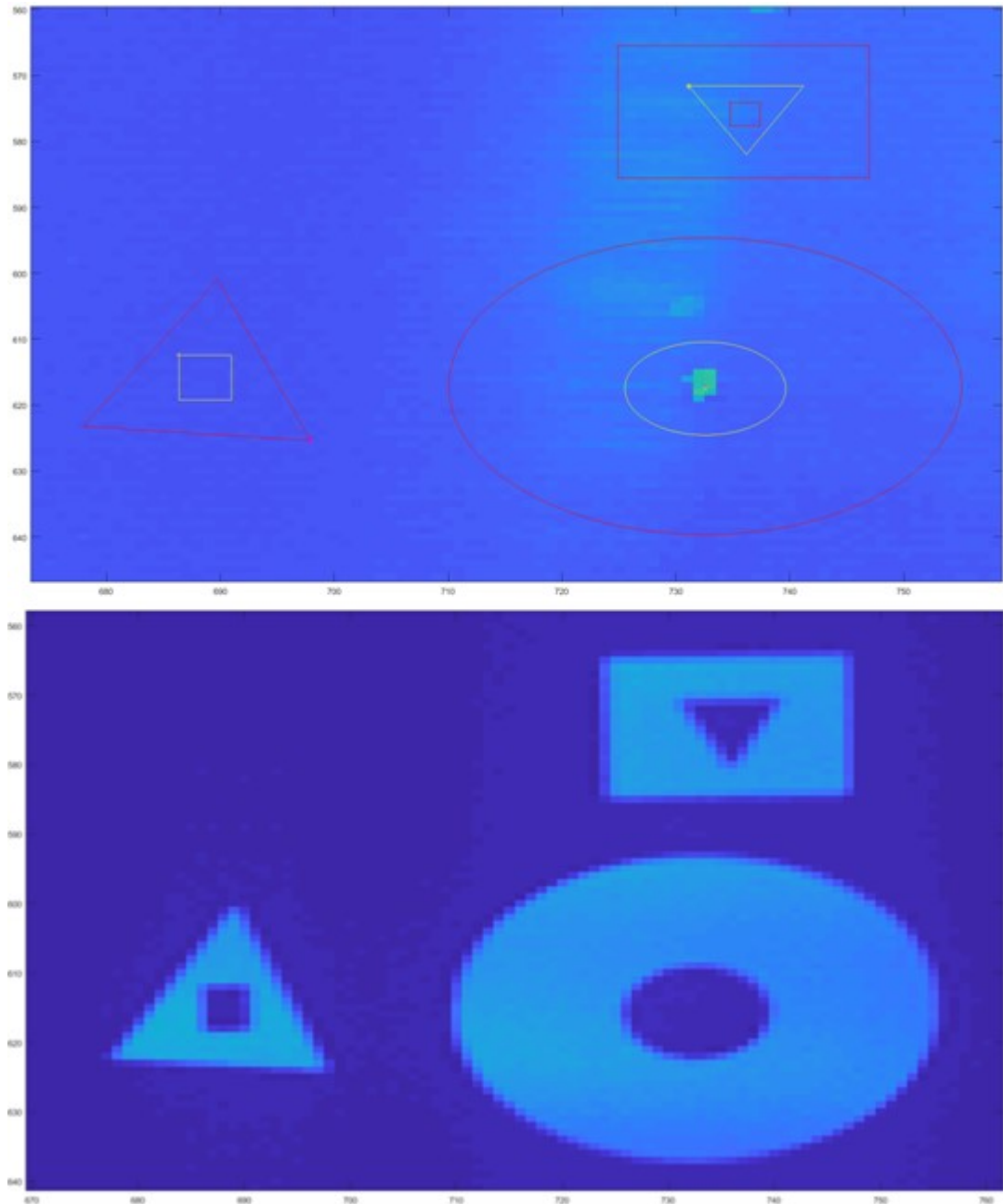
Kalibroiheräte aiheutti suuren intensiteettivasteen useammassa kuin yhdessä vierekkäisessä kuvapikselissä. Kuvassa 27 on esitetty yksittäisen kalibroiherätteen aiheuttama vaste. Intensiteetti-arvoltaan suurin pikseli löytyi intensiteetiltään suurimpien pikselien keskivaiheilta. Pikselin intensiteettimaksimi kuvasi siis riittävän hyvin vasteen sijaintia. Toisaalta pikselien intensiteettien painotettu keskiarvo olisi saattanut kuvata vielä tarkemmin vasteen sijaintia.



Kuva 27. Alimman kalibroiherätteen aiheuttama vaste. Maksimi-intensiteetti oli arvoltaan 204 ja sijainniltaan pikseli (677, 733).

Koordinaatistomuunnos ei ollut täysin tarkka, vaan koordinaatistomuunnoksen jälkeen koordinaatit täytyi pyöristää tasaluvuiksi, jolloin todellinen peili saattoi vaihtua viereiseen. Lisäksi koordinaatistomuunnoksen MATLAB-koodi ei ottanut huomioon vierekkäisten mikropeilirivien limittäisestä sijainnista johtuvaa eri paikkaa DMD-koordinaatistossa.

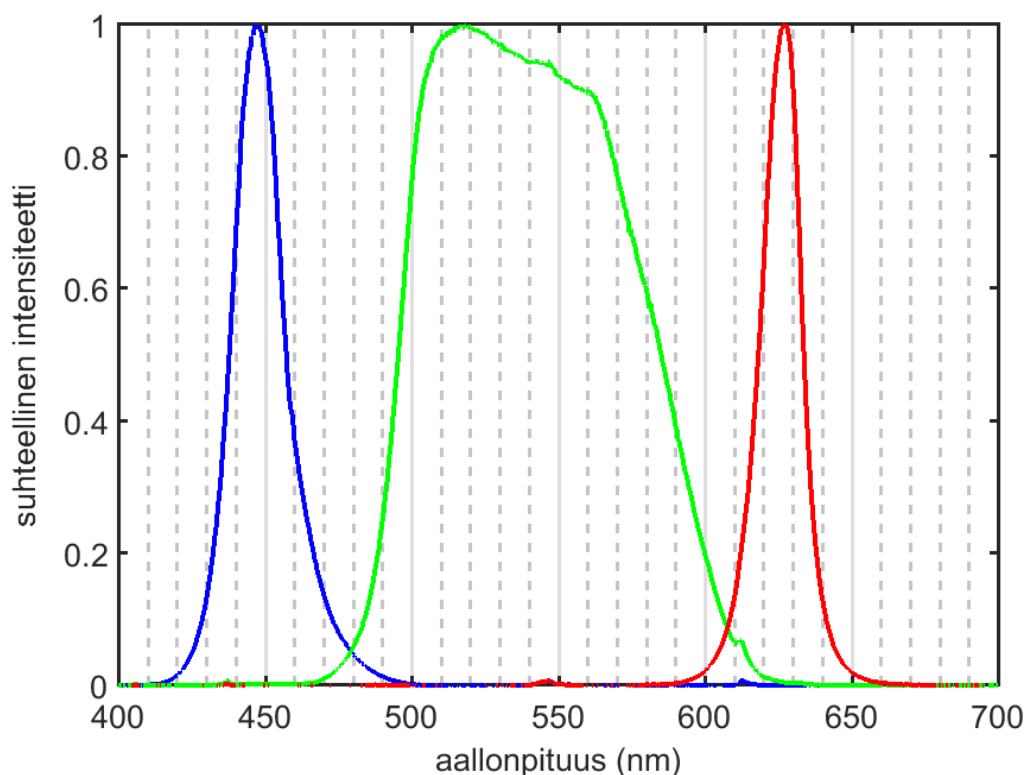
Paikkakalibrointi vaikutti onnistuneen kalibroinnin jälkeisen testauksen mukaan: kamerakuvasta valitut eksitaatioalueet ja niiden aikaansaama vaste vastasivat erinomaisesti toisiaan. Kuvassa 28 on esitetty valitut eksitaatioalueet ja kamerakuva aikaansaadusta vas- teesta. Eksitaatioalueet valittiin punaisella viivalla ja pois jätettävät alueet keltaisella vii- valla. Valittujen eksitaatiokuvioiden ja aikaansaatujen vastekuvioiden koordinaatit vasta- sivat toisiaan.



Kuva 28. Paikkakalibroinnin toimivuuden testaus. Eksitaatioalueet valittiin punaisella viivalla ja pois jätettävät keltaisella viivalla (ylempi kuva). Kamerakuva aikaansaaduista valokuvioista (alempi kuva).

4.2 Ledien spektrit

Kuvassa 29 on esitetty kaikkien ledien intensiteetit eri aallonpituuksilla suhteessa maksimi-intensiteetteihinsä. Käyrien korkeudet eivät ole vertailtavissa keskenään. Ledien emissiot sijoituivat 400 nm:n ja 700 nm:n välisille aallonpituuksille. Kuvasta 10 näemme, että videoprojektorin vihreä LED stimuloi PtTFPP:tä 507 nm:n ja 540 nm:n absorptiokaistoilla.



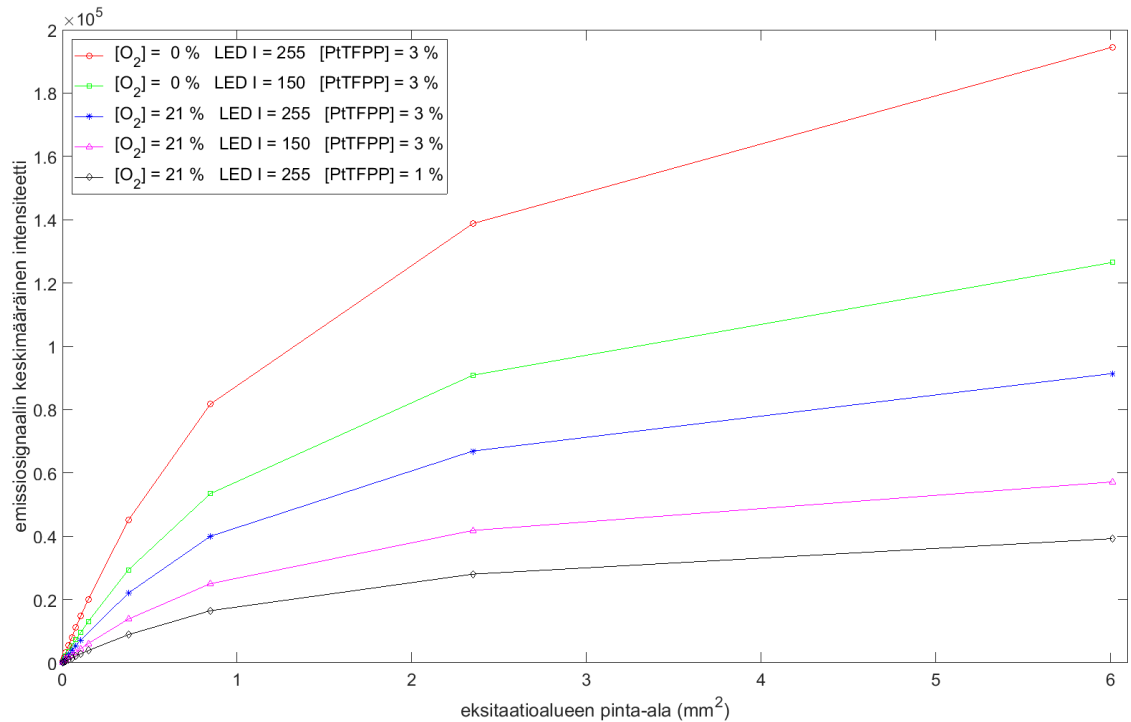
Kuva 29. Ledien mitatut emissiospektrit. Vasemmalla sinisen ledin spektri, keskellä vihreän ledin, ja oikealla punaisen.

Mitattuja emissiospektrejä verrattiin ledien valmistajan antamiin emissiospektreihin [39-41]: Punaisen ledin emissiospektri oli muodoltaan ja sijoittumiseltaan hyvin samanlainen kuin valmistajan mittaama emissiospektri. Sinisen ledin muoto oli samanlainen, mutta siirtynyt siten, että huippuintensiteetti saavutettiin 8 nm pienemmällä aallonpituudella kuin valmistajan mittaamassa emissiospektrissä. Vihreän ledin emissiospektrin muoto ja sijoittuminen olivat samanlaiset kuin valmistajan mittaaman emissiospektrin yläosa 0,3:n suuruudesta suhteellisesta intensiteetistä ylöspäin. Toisin kuin videoprojektorin vihreällä ledillä, valmistajan mittaama vihreän ledin emissiospektri levittäytyi juurestaan suuremmille aallonpituuksille, ja pienemmillä aallonpituuksilla oli ylimääräinen nousu huippunaan 0,3:n suhteellinen intensiteetti 430 nm:n kohdalla. Ledien suorituskykyjen erot johtuivat normaaleista valmistuksessa aiheutuvista poikkeavuuksista.

4.3 Fluoresenssimittauksen suorituskyvyn määrittäminen

Fluoresenssin emissiosignaaliin ja vaihe-eron signaaliin näkyi kohinaa, vaeltamista sekä ajoittain ilmestyvää säännöllistä häiriötä, jonka aiheuttajaa ei pystytty määrittämään, ja joka aiheutti vaihe-erosignaaliin jopa 0,4 asteen heittoa. Lisäksi signaaliin näkyi 50 Hz:n taajuinen häiriö, jos mittaushuoneen loistelamput olivat päällä. Häiriöt signaaleissa kuvautuivat mittaussignaalin keskihajonta-arvoihin. Signaalien kohinan arveltiin johtuvan fotoilmaisimen kohinasta ja emissiovalon kohinasta, eikä eksitaatiopinta-alan suuruus näyttänyt vaikuttavan emissiokohinan suuruuteen. Suurilla eksitaatiopinta-aloilla emissiosignaaliin erottui jyrkkä lasku mittausten alussa, jota seurasi loivempi lasku. Ledin intensiteetin maksimiarvolla kyseinen emissiosignaalin pieneneminen oli selvästi erotettavissa normaalissa happipitoisuudessa 640 mikromeilin ollessa on-asennossa, ja hapettomassa pitoisuudessa 230 mikromeilin ollessa on-asennossa. Pienemmällä ledin intensiteettiä mittausta tehdessä vastaavat on-asentoisten mikromeilien määrät olivat yli kymmenenkertaisia. Syynä kyseiseen emission vähenemiseen oli luultavasti fluoroforin fotohajoaminen ja ledin lämpeneminen. Ilmiön vuoksi mittausten alun intensiteetin ja vaihe-eron arvoja ei otettu mukaan keskiarvojen ja keskihajontojen määrittämiseen.

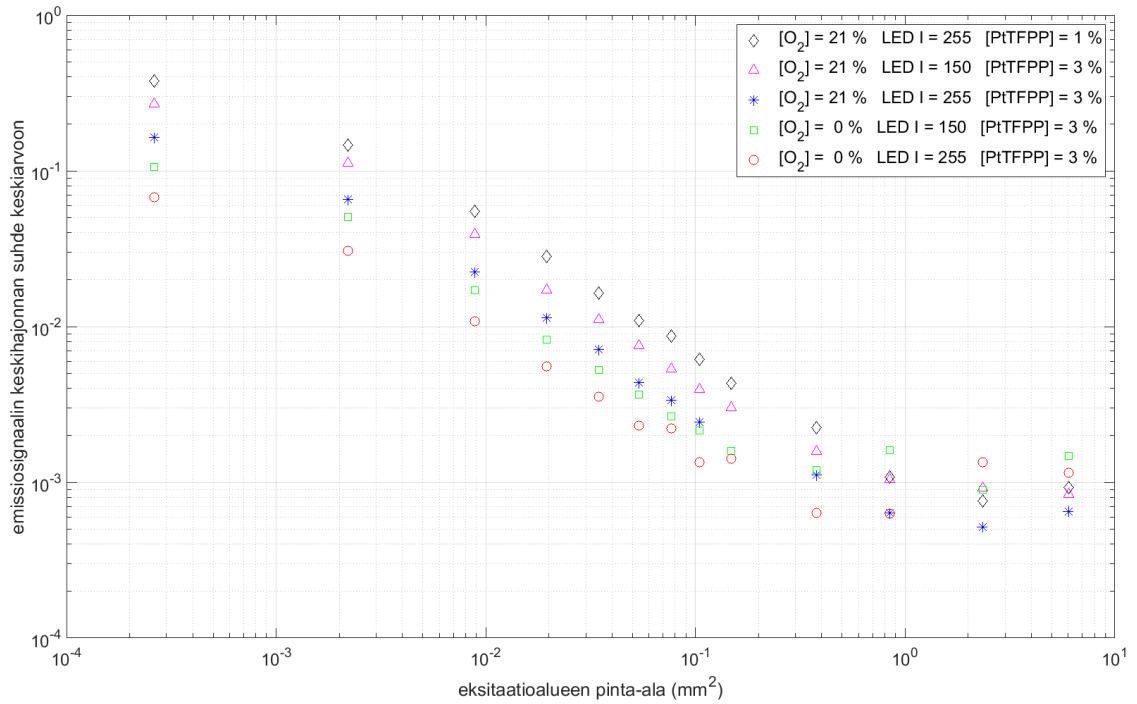
Kuvassa 30 on esitetty fotoilmaisimen mittaama, eksitaatiovalolla aikaansaadun fluoresenssin emissiovalon aiheuttaman fotoilmaisimen signaalin keskiarvo suhteessa eksitaatioalueen pinta-alaan. Fluoresenssin emissio oli voimakkaampaa hapettomissa olosuhteissa kuin normaalissa huoneilman happipitoisuudessa, kuten aiemmin todettiin tapahtuvan happiherkillä fluorofooreilla. Fluoresenssin emissio oli myös selvästi voimakkaampaa, kun eksitaation intensiteettiä kasvatettiin lisäämällä ledin intensiteettiä. Emissiosignaalin intensiteetti pieneni noin kolmasosaan polymeerinäytteen PtTFPP-pitoisuuden laskiessa kolmesta massaprosentista yhteen massaprosenttiin.



Kuva 30. Fluoresenssin emission intensiteetin keskiarvo eksitaatiopinta-alan funktiona.

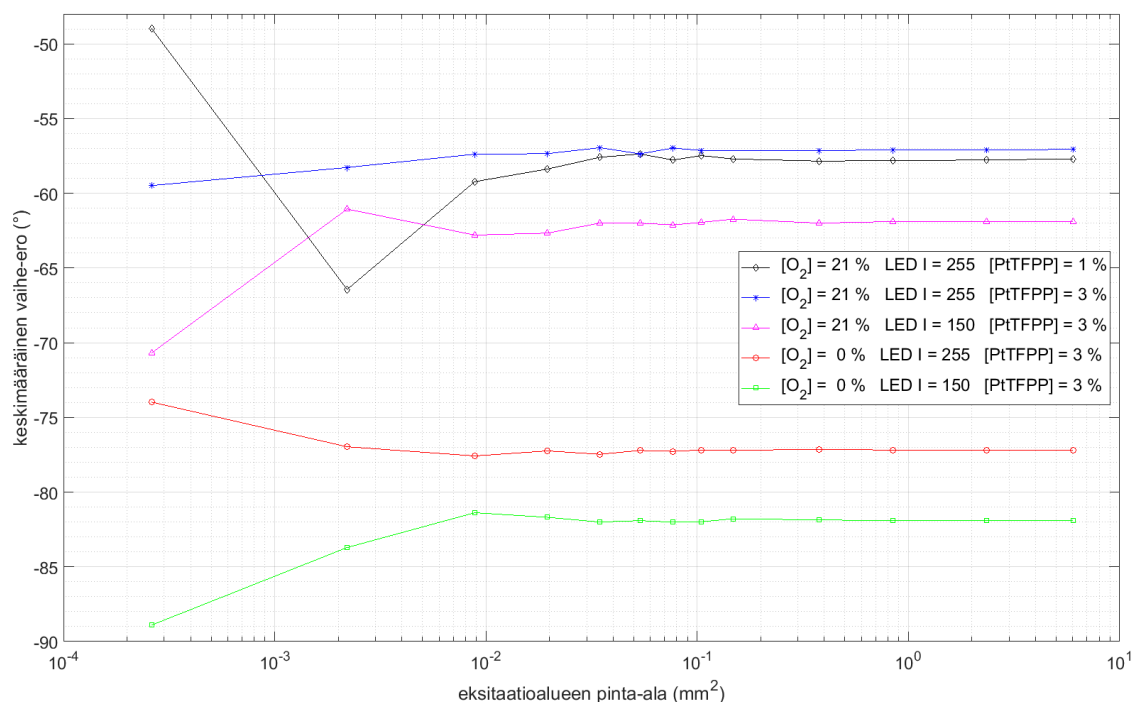
Ihannetapauksessa emissiovalon intensiteetin oletettiin kasvavan lineaarisesti suhteessa eksitaatioalueen pinta-alaan. Koska paraboloidisen linssin oletettiin keräävän keskeltä tehokkaimmin emissiovaloa ja reunoilta vähiten, suhdekäyrän kulmakertoimen arveltiin pienenevän pinta-alan kasvaessa. Emission intensiteetin kasvu pienienkin eksitaatioalueen suuretessa linssin reunoja kohti. Kulmakertoimen taas oletettiin kasvavan, kun eksitaatioalue ylittäisi linssin tasaiseksi leikatun pinnan, koska eksitaatiovalo heijastuisi tällöin pyörähdysparaboloidipinnasta lähemmäs keskustaa. Mittauksissa eksitaatioalue ei kuitenkaan ylittänyt tasaisen linssin aluetta, joten oletusta ei voitu tutkia.

Emissiovalon intensiteettisignaalin vakautta oli keskihajonnan sijaan helpompi vertailla ja selkeämpää tarkastella keskihajonnan suhteella keskiarvoon. Kuvassa 31 on esitetty logaritmisilla asteikoilla emissiovalon intensiteetin keskihajonnan ja keskiarvon osamäärä suhteessa eksitaatioalueen pinta-alaan. Emissiosignaali oli suhteellisesti sitä vakaampi mitä suuremmaksi eksitaatioalue kasvoi, noin $0,1 \text{ mm}^2$:n eksitaatiopinta-alaan asti, jonka jälkeen häiriöt lisääntyivät emissiosignaalin. Emissiosignaali oli selvästi vakaampi hapettomissa olosuhteissa kuin normaalissa huoneilman happipitoisuudessa. Myös suurempi ledin intensiteetti ja polymeerikalvon fluoroforipitoisuus vakautti emissiosignaalia.



Kuva 31. Emissiosignaalin keskihajonnan ja keskiarvon osamäärä eksitaatiopinta-alan funktiona.

Kuvassa 32 on esitetty fluoresenssin vaihe-eron keskiarvo suhteessa logaritmiseen eksitaatioalueen pinta-alaan. Fluoresenssin vaihe-ero oli suurempi hapettomissa olosuhteissa kuin huoneilman normaalissa happipitoisuudessa, kuten kappaleessa 3.2 todettiin tapahtuvan happiherkillä fluoroforeilla. Ledin intensiteetin pienentäminen kasvatti vaihe-eroa. Syynä ledin kirkkaudensäädön vaikutukseen vaihe-eron arvoon saattaa olla ledin kirkkauden säädön toimiminen pulssituksella. Vaihe-eron arvon muutos happipitoisuuksien 0 % ja 21 % välillä oli kuitenkin noin 20 astetta ledin intensiteetistä riippumatta. Tulosten vertailtavuuden kannalta ledin intensiteetti on pidettävä vakiona tulevissa vaihe-eromitauksissa.

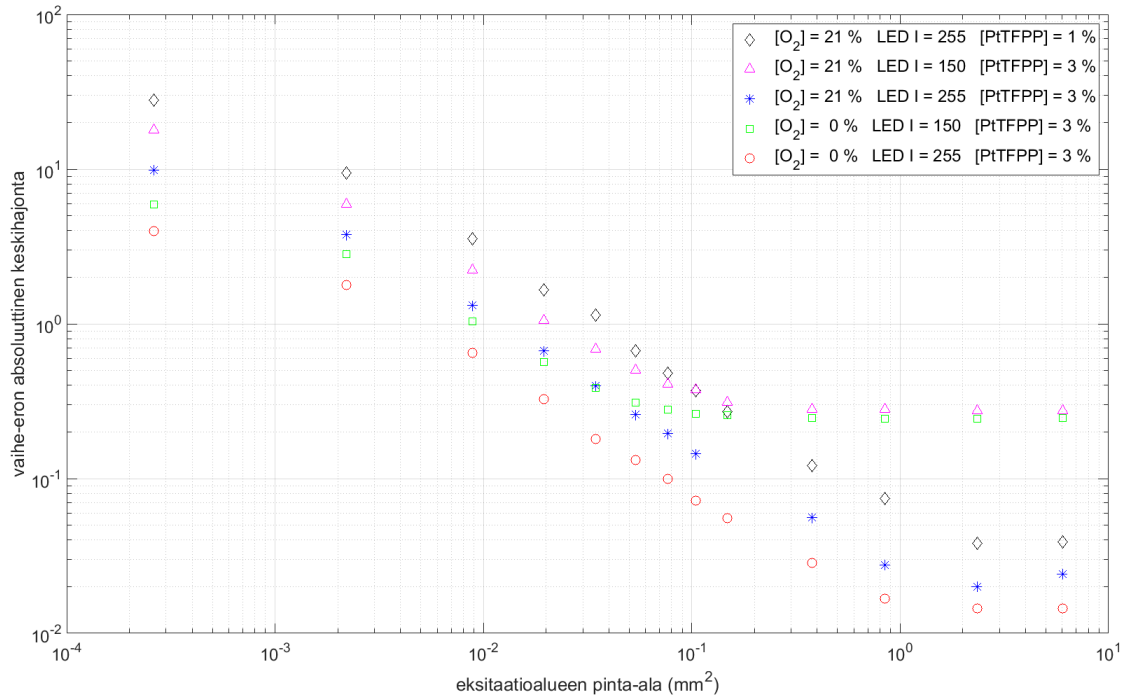


Kuva 32. Fluoresenssin vaihe-eron keskiarvo eksitaatiopinta-alan funktiona.

Kuvassa 32 vaihe-eromittaus näytti antavan suhteellisen luotettavan vaihe-eroarvon 0,01 mm²:n kokoisesta eksitaatioalueesta lähtien, kun polymeerikalvon fluoroforipitoisuus oli 3 massaprosenttia. Pienemmällä fluoroforipitoisuudella vaihe-ero asettui lähelle tarkkaa vaihe-eroarvoaan vasta suuremmilla eksitaatiopinta-aloilla. Eri fluoroforipitoisilla polymeerikalvoilla vaihe-ero asettui yli 0,5 asteen etäisyydelle toisistaan, mutta ilmiön toistuvuutta ei varmistettu tässä työssä. Fluoroforipitoisuudella 3 m-% ja ledin maksimi-intensiteetillä 255 fluoresenssin vaihe-eroksi mitattiin 57 ° happipitoisuudessa 21 % ja 77 ° happipitoisuudessa 0 %.

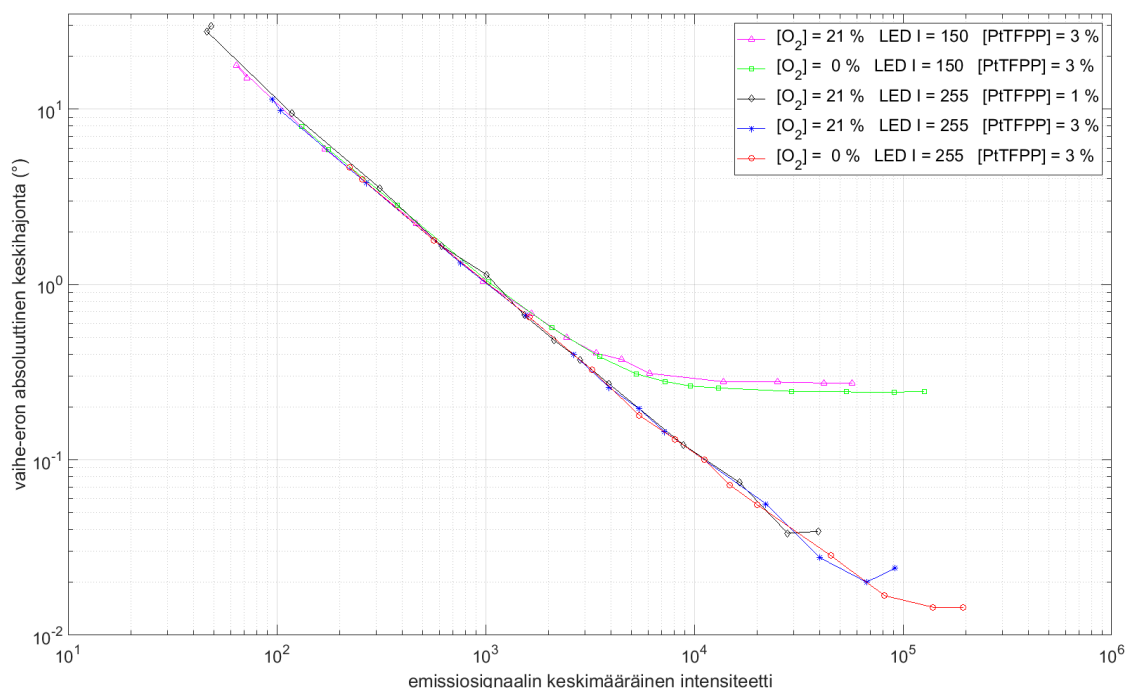
Hapettomissa olosuhteissa vaihe-ero näytti kuvan 32 perusteella asettuvan lähemmäs todellista arvoaan pienemmillä eksitaatioalueen pinta-aloilla kuin normaalissa huoneilman happipitoisuudessa. Samoin näytti käyvän suuremmalla ledin intensiteetillä. Näitä kahta silmämääräistä havaintoa tarkasteltiin seuraavassa mittausanalyysissä tarkemmin.

Kuvassa 33 on esitetty logaritmisilla asteikoilla fluoresenssin vaihe-eron keskihajonta suhteessa eksitaatioalueen pinta-alaan. Vaihe-ero oli tarkempi vähempihappisessa ympäristössä, suuremmalla polymeerikalvon fluoroforipitoisuudella, ja suuremmalla ledin intensiteetillä. Vaihe-eron keskihajonta pieneni sekä absoluuttisesti että suhteellisesti eksitaatiopinta-alan kasvaessa, ledin intensiteetin maksimiarvolla 1 mm²:n eksitaatiopinta-alaan asti ja pienemmällä ledin intensiteetillä 0,1 mm²:n eksitaatiopinta-alaan asti. Pienemmällä ledin intensiteetillä vaihe-erojen keskihajonnat jäivät selvästi suurempiin arvoihin kuin ledin intensiteetin maksimiarvolla. Jatkon kannalta mittauksia päätettiin jatkaa täydellä ledin kirkkauden intensiteetillä.



Kuva 33. *Vaihe-eron keskihajonta eksitaatiopinta-alan funktiona.*

Kuvassa 34 on esitetty logaritmisilla asteikoilla fluoresenssin vaihe-eron keskihajonta suhteessa fluoresenssin emissiovalon keskimääräiseen suuruuteen. Vaihe-eron keskihajonta riippui emissiovalon intensiteetistä, kun ledin intensiteetti oli asetettu maksimiarvoonsa. Emissiosignaalin intensiteetin ja vaihe-eron keskihajonnan väliseen riippuvuuteen ei vaikuttanut ympäristön happipitoisuus eikä fluoroforin pitoisuus polymeerikalvossa. Vaihe-eron keskihajonta oli 1° , kun emissiosignaalin intensiteetin arvo oli 1 000. Vaihe-eron keskihajonta oli $0,5^\circ$ emissiosignaalin intensiteetin arvolla 2 000, ja $0,1^\circ$ arvolla 10 000.



Kuva 34. Vaihe-eron keskihajonta emissiosignaalin intensiteetin keskiarvon funktiona.

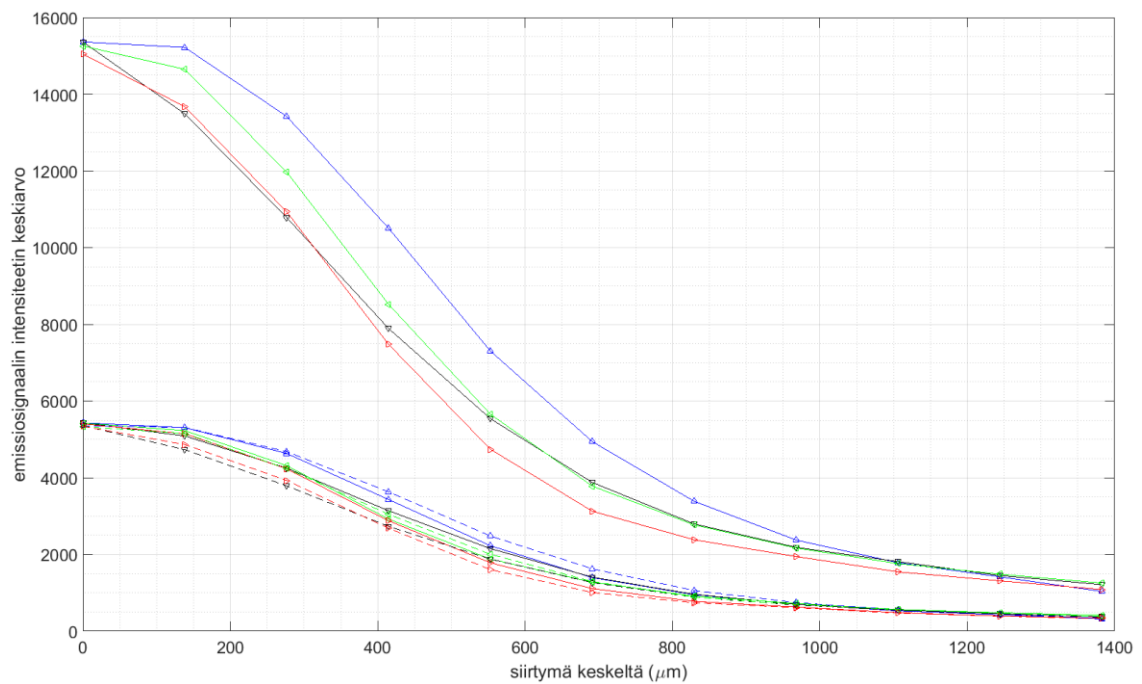
Mittauksia tehtiin myös optisen suurennuksen arvolla 2,4, kun himmennin oli täysin auki (5,0 mm) ja lähes kiinni (0,1 mm). Himmentimen ollessa täysin auki himmentimen aukon halkaisija oli 50 kertaa suurempi, ja pinta-ala oli 2500-kertainen. Emission suuruudeksi mitattiin 50-kertainen arvo. Himmentimen ollessa täysin auki vaihe-eron arvo oli tarkasti oikea jo kaikkien mikrobeilien ollessa off-asennossa: Kaikkien mikrobeilien ollessa off-asennossa paraboloidisen linssin keskustassa näkyi silmämääräisesti selvä eksitaatiovalon intensiteetin kasvu, joka johtui DMD:ltä tulevan taustavalon heijastumisesta paraboloidisen linssin reunojen kautta keskustaan. Ilmiön vuoksi optiikan suurennuksen pitää olla tarpeeksi pieni, jotta DMD:ltä tuleva taustavalo ei pääse heijastumaan paraboloidisen linssin reunoista keskustaan.

Tulokset pätevät käytetyllä mittauslaitteistolla ja fluorofoori-polymeerimatriisilla. Mittaukset tehtiin kasvattaen eksitaatioympyrää, jonka keskipiste sijaitsi paraboloidisen linssin keskustassa. Täten mittaustulokset olivat mahdollisimman ihanteelliset, koska eksitaatiovalon kohdennus ja emissiovalon keräyskyky saattavat heikentyä siirryttäessä kauemmaksi paraboloidisen linssin keskustasta. Tätä ilmiötä tutkittiin seuraavassa kokeessa.

Ledin käyttäminen täydellä teholla aiheuttaa mittauksen alussa emissiosignaalin vaellusta ja saattaa kuluttaa lediä enemmän. Vaihe-eron luotettavuuden kannalta lediä päätettiin kuitenkin käyttää jatkossa täydellä kirkkaudella ($I = 255$). Mittauslaitteiston optiikassa päädyttiin käyttämään suurennusta 0,8, jolloin DMD:n kaikki mikrobeilit pystyivät samanaikaisesti heijastamaan eksitaatiovalon paraboloidisen linssin yläpään tasaiseksi leikatulle alueelle, jonka halkaisija oli 13 mm.

4.4 Fluoresenssi-ilmaisun paikkariippuvuuden määrittäminen

Kuvassa 35 on esitetty emissiovalon intensiteetin keskiarvo suhteessa eksitaationeliön keskipisteen etäisyyteen paraboloidisen linssin keskustasta. Emission intensiteetti oli suurempi hapettomissa olosuhteissa: kuvan ylemmät käyrät mitattiin 0 %:n happipitoisuudessa ja alemmat käyrät 21 %:n happipitoisuudessa. Kuvassa käyrien väri ja kolmiolla merkittyjen mittauspisteiden suunta kertoo mihin eri suuntaan eksitaationeliötä etäännytettiin paraboloidisen linssin keskustasta. Näytelevyn siirron jälkeen toistettujen mittausten mittauspisteet yhdistettiin kuvassa katkoviivalla.

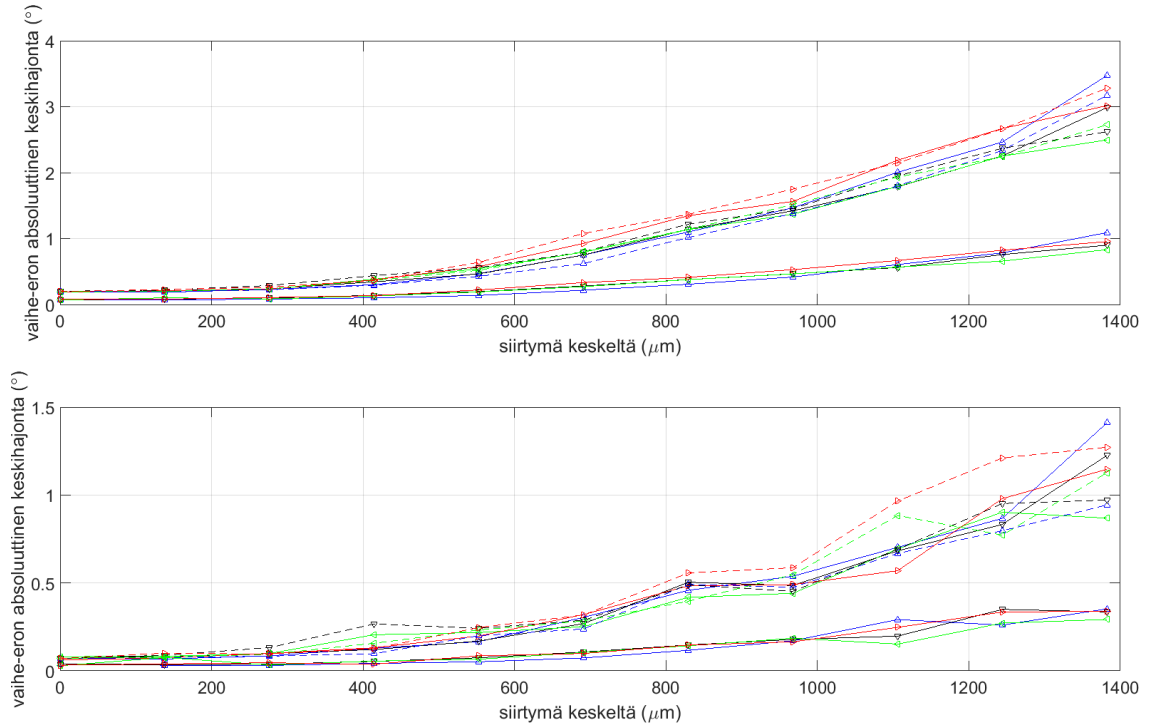


Kuva 35. Emissiosignaalin keskimääräinen intensiteetti $276 \mu\text{m} \times 276 \mu\text{m}$ kokoisen eksitaationeliön keskipisteen etäisyyden funktiona, eri suuntiin paraboloidisen linssin keskustasta (eriväriset käyrät) happipitoisuuksissa 0 % (ylempi käyräjoukko) ja 21 % (alempi käyräjoukko).

Symmetrian mukaisesti oli odotettavissa, että intensiteetti-arvot olisivat yhtä suuria samalla etäisyydellä keskustasta. Mitatuissa arvoissa oli kuitenkin hiukan eroa riippuen loitonemissuunnasta, koska eksitaatiovalon todellinen lähtöpaikka ei ollut aivan paraboloidisen linssin keskustassa, ja koska fotoilmaisin ei välttämättä ollut aivan optisen akselin keskustassa. Emission intensiteetti laski nopeasti siirryttäessä poispäin keskustasta, ja oli pienentynyt viidesosaan $800 \mu\text{m}$:n etäisyydellä paraboloidisen linssin keskustasta sekä 21 %:n että 0 %:n happipitoisuudessa.

Kuvassa 36 on esitetty vaihe-eron absoluuttinen keskihajonta suhteessa eksitaationeliön keskipisteen etäisyyteen paraboloidisen linssin keskustasta. Yläpuolisessa kuvaajassa vaihe-eron keskihajonta on määritetty koko 55 sekunnin ajalta, kun taas alapuolisessa kuvaajassa mitatuista vaihe-eron arvoista on määritetty keskiarvot yhden sekunnin välein

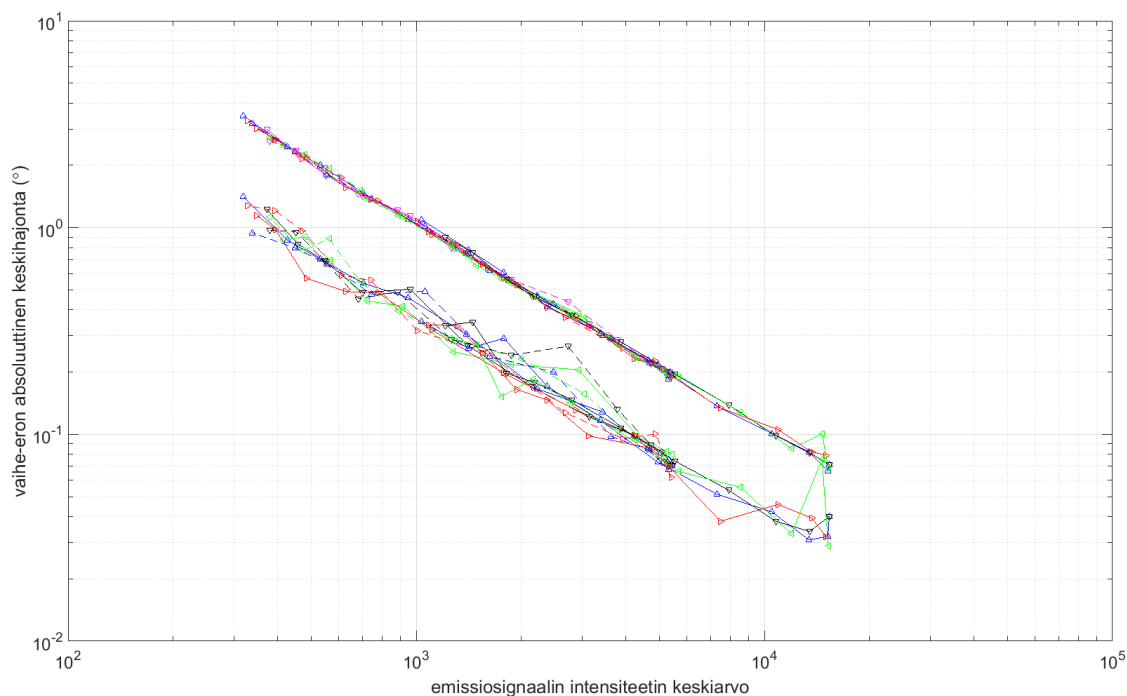
ja keskihajonta on laskettu näiden keskiarvojen perusteella. Alapuolinen tilanne vastaa paremmin lopullista happianturin käyttötarkoitusta, ja antaa tarkempia vaihe-eron arvoja. Kuvassa käyrien väri ja kolmiolla merkittyjen mittauspisteiden suunta kertoo mihin eri suuntaan eksitaationeliötä etäännytettiin paraboloidisen linssin keskustasta. Näytelevyn siirron jälkeen toistettujen mittausten mittauspisteet yhdistettiin kuvassa katkoviivalla.



Kuva 36. Vaihe-eron keskihajonta $276 \mu\text{m} \times 276 \mu\text{m}$ kokoisen eksitaationeliön keskipisteen etäisyyden funktiona laskettuna 55 sekunnin ajalta (ylempi kuvaaja) ja yhden sekunnin keskiarvojen perusteella (alempi kuvaaja), eri suuntiin paraboloidisen linssin keskustasta (eriväriset käyrät) happipitoisuuksissa 0% (ylempi käyräjoukko) ja 21 % (alempi käyräjoukko).

Vaihe-ero oli luotettavampi hapettomissa olosuhteissa: kuvaajien alemmat käyrät mitattiin 0 %:n happipitoisuudessa ja ylemmät käyrät 21 %:n happipitoisuudessa. Ylempässä kuvaajassa vaihe-eron keskihajonta pysyi alle yhdessä asteessa $700 \mu\text{m}$:n etäisyyteen asti, hapettomissa olosuhteissa $1400 \mu\text{m}$:n etäisyyteen asti. Alemmassa kuvaajassa vaihe-eron keskihajonta pysyi alle yhdessä asteessa $1100 \mu\text{m}$:n etäisyyteen asti ja hapettomissa olosuhteissa alle $0,4^\circ$:ssa $1400 \mu\text{m}$:n etäisyyteen asti.

Kuvassa 37 on esitetty vaihe-eron keskihajonta suhteessa emissiosignaalin intensiteetin keskiarvoon. Ylempien käyrien arvot on laskettu koko 55 s ajalta. Suureet olivat riippuvaisia toisistaan. Arvot osuivat täsmälleen samalle käyrälle, kuin edellisen kokeen arvot kuvassa 34. Emissiosignaalin intensiteetin ja vaihe-eron keskihajonnan väliseen riippuvuuteen ei siis vaikuta eksitaatioalueen sijainti. Alempien käyrien arvot on laskettu 1 sekunnin keskiarvoista, jolloin emissiosignaalin intensiteetin keskiarvot pysyivät samoina, mutta vaihe-eron keskihajonnat (katso kuva 37) olivat pienempiä.



Kuva 37. Vaihe-eron keskihajonta emissiosignaalin intensiteetin keskiarvon funktiona laskettuna 55 sekunnin ajalta (ylemmät käyrät) ja yhden sekunnin keskiarvojen perusteella (alemmat käyrät).

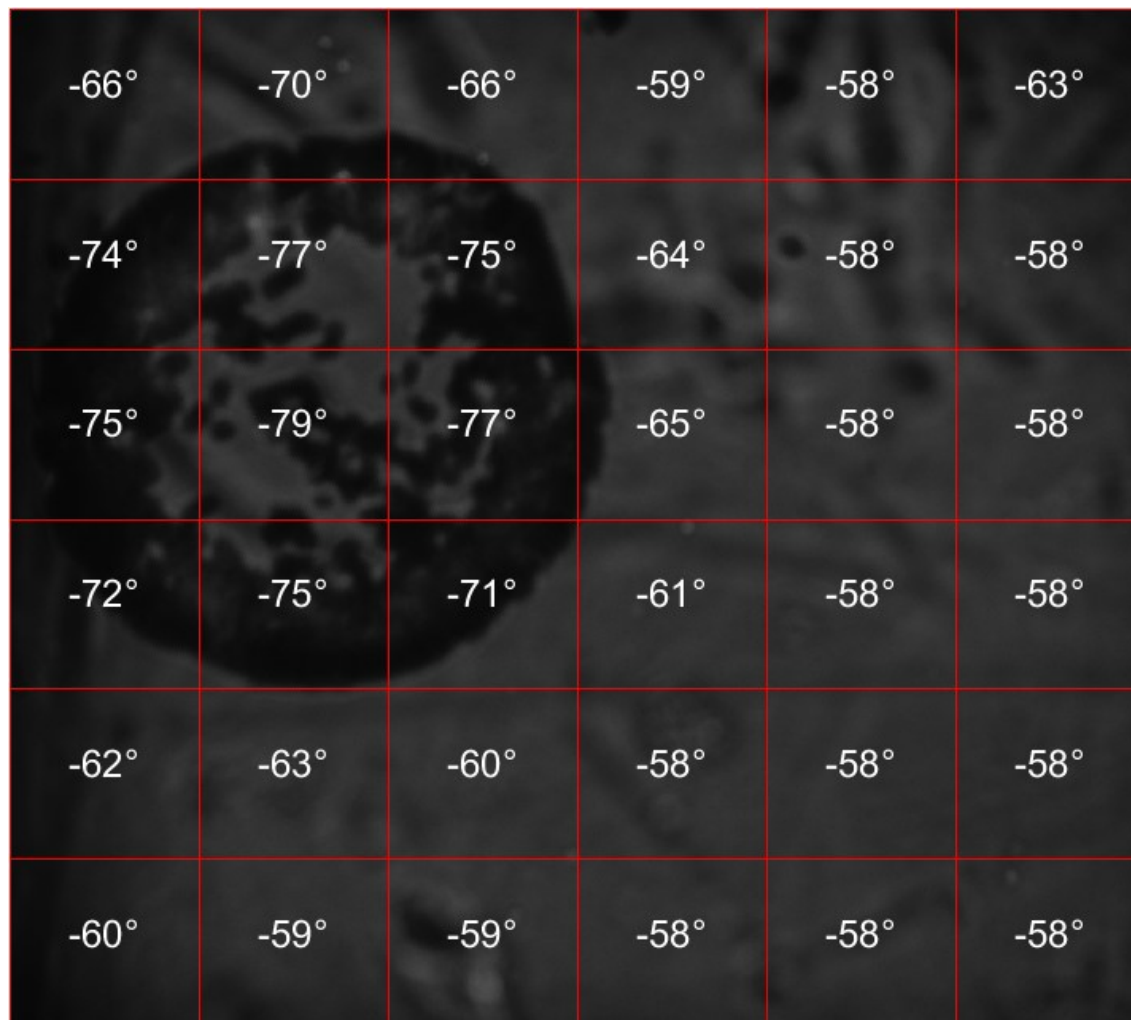
4.5 Fluoresenssilaitteiston skannauskyky

Skannaustestissä vaihe-eron arvo määritettiin $250\ \mu\text{m} \times 250\ \mu\text{m}$ kokoisilta alueilta. Mittaus oli altis tärähdyksille: kyynärpään iskeytyminen pöytään saattoi muuttaa jopa pysyvästi emission amplitudia ja vaihe-eroa. Tämä saattoi johtua näytelevyn ja paraboloidisen linssin välisen kontaktin muutoksesta.

Happipitoisuudessa 21 % keskimääräinen vaihe-eron arvo oli noin $57,3^\circ$ jokaisessa skannausneliössä. Vaihe-eron keskihajonnan arvo oli $0,1\text{--}0,8^\circ$ ja keskimääräisen intensiteetin arvo oli yli 1000 jokaisessa skannausneliössä. Happipitoisuudessa 0 % keskimääräinen vaihe-eron arvo oli noin $79,3^\circ$ jokaisessa skannausneliössä. Vaihe-eron keskihajonnan arvo oli $0,1\text{--}0,3^\circ$ ja keskimääräisen intensiteetin arvo oli yli 3000 jokaisessa skannausneliössä.

Kuvassa 38 on esitetty mittausten jälkeinen skannausalue, kun pisara Na_2SO_3 -vesiliuosta oli ehtinyt kuivua. Paraboloidisen linssin keskusta on skannausalueen keskellä. Skannausalue on jaettu 6×6 ruudukkoon, jossa kunkin skannausneliön keskimääräinen, pyöristetty vaihe-eron arvo on näkyvillä. Laitteiston skannauskyky näytti olevan muissakin mittauksissa samanlainen: Keskellä pisaraa vaihe-eron arvo oli lähellä 0 %:n happipitoisuuden arvoa, ja pieneni sitä enemmän mitä vähemmän pisaraa oli skannausneliössä. Kaukana pisarasta vaihe-eron arvo oli lähellä 21 %:n happipitoisuuden arvoa ($57,3^\circ$),

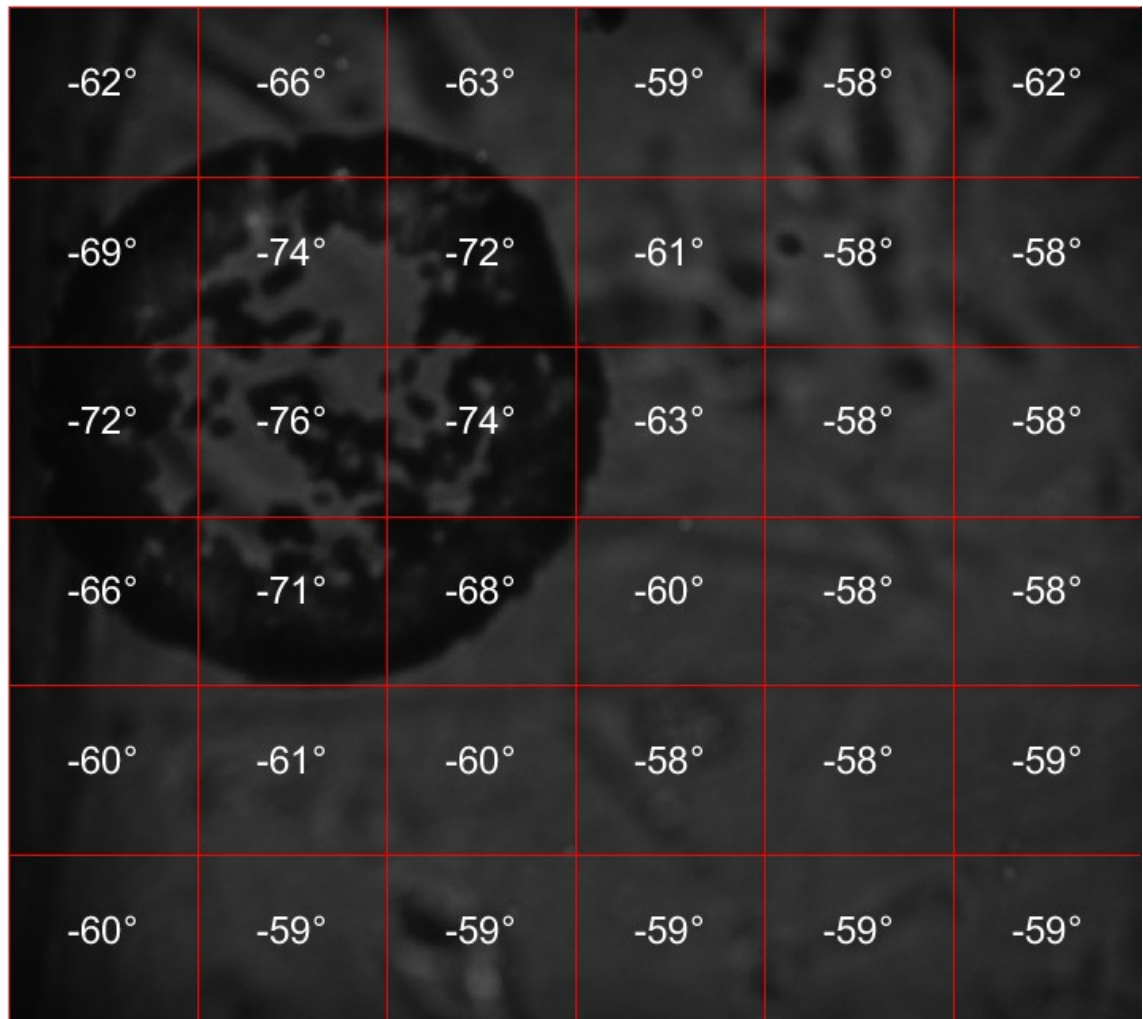
paitsi joissakin skannausneliöissä skannausalueen kulmissa, joissa skannausneliö oli kaukana paraboloidisen linssin keskipisteestä. Aikaisempien mittausten perusteella oli odotettavissakin, että mitä kauemmas skannaus kohdistui paraboloidisen linssin keskustasta, sitä pienempi olisi emissiosignaalin intensiteetti ja täten vaihe-eron luotettavuus.



Kuva 38. Vaihe-eron arvot $250\ \mu\text{m} \times 250\ \mu\text{m}$ kokoisissa skannausneliöissä. Skannausalue oli jaettu 36 skannausneliöön ja paraboloidisen linssin keskusta oli skannausalueen keskellä. Skannausalueen vasemmassa yläosassa näkyy kuivunut pisara Na_2SO_3 -vesiliuosta.

Skannausneliöiden vaihe-eroja ja happiympäristöjen suhteellisia pinta-aloja ei voitu vertailla keskenään, koska mittauksen aikaista pisaran kokoa ei pisaran kuivumisesta johtuen pystytty tarkasti määrittelemään mittauksen jälkeen otetusta kamerakuvasta. Kuvassa 39 on esitetty skannausneliöiden vaihe-eron arvot, jotka mitattiin 400 sekunnin viiveellä edellisestä mittauksesta. Aikaisempaan mittaukseen verrattuna vaihe-eron arvot olivat pienempiä kaikkialla pisaran läheisyydessä. Ainoana muuttuvana tekijänä mittausten välillä oli Na_2SO_3 -vesiliuospisaran kuivuminen. Myöskään pisaran keskellä sijainneen skannausneliön vaihe-ero ei ollut enää maksimissaan. Pisaran kuivumisen vaikutuksesta

johtuva tulosten virheellisyys huomioiden mitatut vaihe-erojen arvot kuvasivat suhteellisen hyvin skannausalueensa happipitoisuutta.

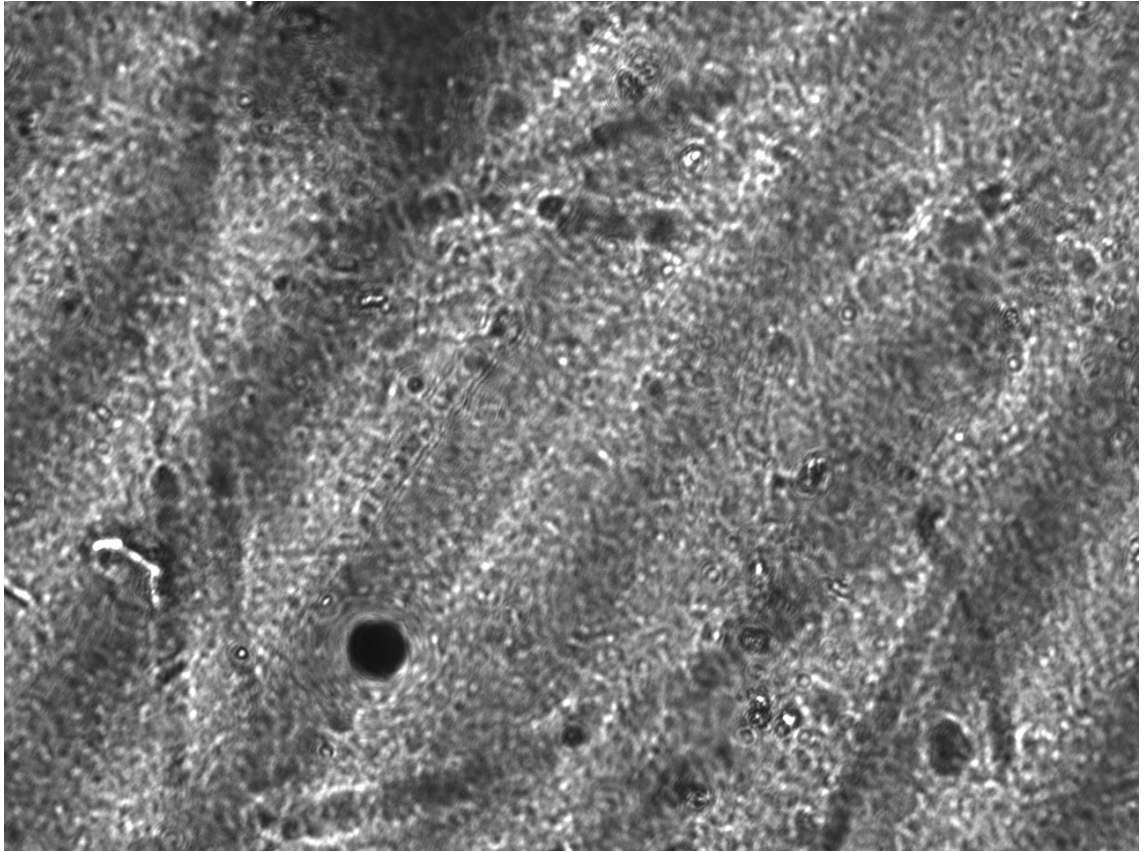


Kuva 39. Vaihe-eron arvot skannausneliöissä 6 min ja 40 s myöhemmin.

4.6 Eksitaatiovalon resoluutio

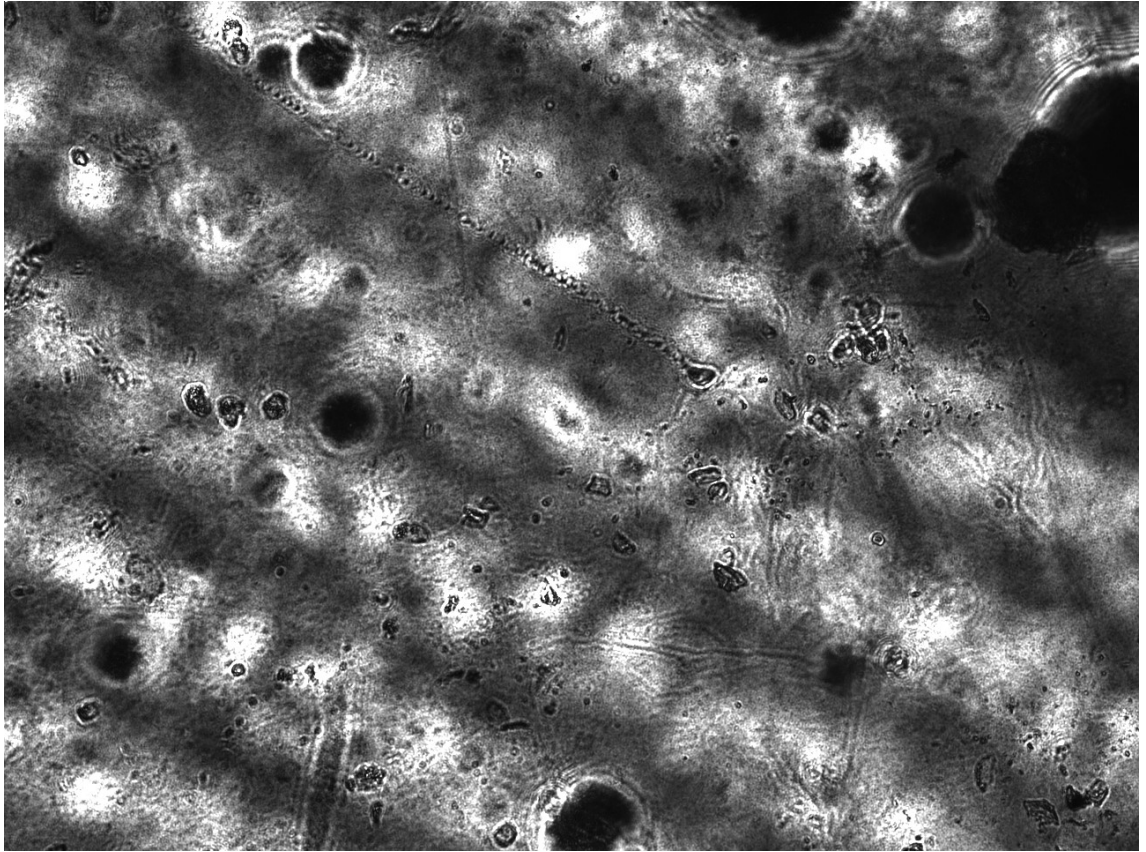
Eksitaatiovalo kohdistettiin näytteeseen, jossa oli pelkkä lasi, diffuuseri, lasin päällä oleva paperi tai lasin päällä oleva läpinäkyvä muoviteippi. Eksitaatiovalon resoluutioviivat erottuivat heikoiten paperilla ja parhaiten teipillä. Resoluutioviivat erottuivat sitä paremmin, mitä suljetumpi himmennin oli. Parhaiten resoluutioviivat erottuivat kuitenkin silloin, kun himmennin ei ollut aivan minimiasennossaan.

Kuvassa 40 on esitetty kamerakuva 110 μm leveistä resoluutioviivoista teipillä, kun himmennin ei ollut säädetty parhaimpaan asentoonsa resoluutiotarkkuuden kannalta. Resoluutioviivat erottuvat kuvassa niin huonosti, että voidaan sanoa resoluutioviivojen sulautuneen toisiinsa.



Kuva 40. Eksitaatiovalo teipillä. Valaistujen resoluutioviivojen leveys ja etäisyys toisistaan olivat $110\ \mu\text{m}$. Valaistut resoluutioviivat näkyvät ylöspäin oikealle viettävinä valoisampina urina ja resoluutioviivojen välissä olevat valaisemattomat alueet niiden välissä tummempina urina.

Kuvassa 41 on esitetty $104\ \mu\text{m}$ leveät resoluutioviivat teipillä, kun himmennin on asetettu lähelle minimiasentoaan. Tällä leveydellä resoluutioviivat erottuivat vielä toisistaan. Mittausten perusteella voitiin todeta, että resoluutio oli sopivalla himmenninsäädöllä $100\ \mu\text{m}$:n luokkaa.



Kuva 41. Eksitaatiovalo teipillä himmentimen ollessa lähellä minimiään. Valaistujen resoluutioviivojen leveys ja etäisyys toisistaan olivat $104\ \mu\text{m}$.

5. YHTEENVETO

Tässä työssä lisättiin BioMediTechillä kehitettyyn fluoresenssiin perustuvaan hapenmittauslaitteistoon (katso kuva 14) eksitaatiovalon kohdennus DMD:n avulla. Aikaisemmin hapenmittauslaitteistossa käytetty eksitaatiovalon lähde, suoraan paraboloidisen linssi alapuolella sijaitseva ledi (katso kuva 14), korvattiin muokatulla videoprojektorilla DLP LightCrafter 4500 EVM ja sen perään lisätyllä optiikalla (katso kuva 23). Videoprojektorin vihreää lediä (katso kuva 29 emissiospektristä) käytettiin PtTFPP-fluoroforin virittämiseen 507 nm:n ja 540 nm:n herätekaistoilla. Valaisutehoa pienensivät valolähteen ja polymeerikalvon välissä olleet linssit, optiset aukot, peilit ja itse DMD. Rakennetulla laitteistolla saavutettiin kuitenkin vaadittu valaisuteho virittämään PtTFPP-fluoroforeja solukasvatusaltaan pohjalle tarkoitetulla polymeerikalvolla.

DMD:n off-asentoisista mikrobeileistä heijastuu tasaisesti levittäytyvää taustavaloa. Kun himmennin oli tarpeeksi auki, paraboloidisen linssin reunoista keskustaan heijastuva taustavalo oli jopa silmin nähtävissä. Jos taustavalon ei haluta häiritsevän hapenmittausta, optisen suurennuksen on oltava niin pieni, että koko DMD:ltä tuleva valo kohdistuu vain paraboloidisen linssin yläpään tasaiseksi leikatulle alueelle. Jos eksitaatiovalon haluaa tuoda kohteeseen vinossa kulmassa, paraboloidisen linssin reunaan on leikattava heijastuspinta eksitaatiovalolle ja osa DMD:ltä tulevasta valosta on mahduttava siihen välttämättä turhaa taustavalon heijastumista paraboloidisen linssin leikkaamattomista reunoista.

Eksitaatiovalo ei ollut aivan yhdensuuntaista, joten eksitaatiovaloa osui myös tarkoitetun alueen ulkopuolelle. Tarpeeksi lähelle toisiaan tuodut eksitaatiovalon resoluutioviivat alkoivat sulautua toisiinsa (katso kuva 40). Himmennimen aukon pienentäminen tarkensi eksitaatiovalon resoluutiota, saavuttaen maksimin lähellä himmennimen aukon minimiä. Resoluutio oli 0,1 mm:n luokkaa, ja se oli myös työn alussa asetettu tavoite.

Happipitoisuuksien muutoksia tarkkailtiin mittaamalla happiherkän fluoroforin eksitaatiovalon ja emissiovalon vaihe-eron muutoksia. Eksitaatiovalo pulssitettiin valonlähteellä. Stern-Volmerin yhtälö (katso yhtälö 2) määrittää riippuvuuden vaihe-eron ja ympäristössä vallitsevan hapen osapaineen välille. Lopullisella hapenmittauslaitteistolla on tarkoitus tarkastella suhteellisia happipitoisuuden muutoksia solujen ympäristössä. Hapenmittauslaitteistoon lisätyn valonkohdistuksen skannauskykyä testattiin jakamalla skannausalue hapettomiin ja hapellisiin alueisiin (katso kuva 38). Mitatut vaihe-erot näyttivät vastaavan ympäristönsä happipitoisuutta.

Mittausten alussa huomattiin emissiosignaalin laskua, jonka syyksi epäiltiin fluoroforin ftohajoamista ja ledin lämpenemistä. Ilmiö on huomioitava mittauksia suunniteltaessa ja analysoitaessa. Tässä työssä kolme sekuntia kestäneistä skannauksista määritettiin vaihe-ero kahden sekunnin mittausdatan perusteella.

Ledin kirkkaus on pidettävä vakiona hapenmittauksessa, koska ledin eri kirkkauksilla saatiin eri vaihe-eron arvoja (katso kuva 32). Ledi suositellaan säädettäväksi maksimaaliseen kirkkausasetukseensa. Vaihe-eron luotettavuus paranee ledin kirkkautta kasvattamalla, mikä näkyy etenkin yli $0,1 \text{ mm}^2$:n kokoisia eksitaatioalueita käytettäessä (katso kuva 33).

Vaihe-eron keskihajonnan todettiin olevan riippuvainen mitatun emission intensiteetistä (katso kuva 34): vaihe-eron luotettavuus oli sitä parempi, mitä suurempi mitattu emission intensiteetti oli. Emission intensiteettiä voitiin kasvattaa (katso kuva 30) ja emissiosignaalia voitiin suhteellisesti vakauttaa (katso kuva 31) kasvattamalla ledin kirkkautta, kasvattamalla eksitaatiopinta-alaa, lisäämällä PtTFPP-fluoroforin pitoisuutta polystyreenissä, tai vähentämällä ympäristön happipitoisuutta. Paraboloidisen linssin todettiin myös keräävän tehokkaimmin emissiovaloa keskeltä ja vähiten reunoilta kuvan 35 mukaisesti.

Vaihe-eron keskihajonta kasvoi symmetrisesti eri suuntiin paraboloidisen linssin keskustasta pois päin siirryttäessä (katso kuva 36). Vaihe-eron keskihajonnan arvo oli alle $1,5^\circ$ pinta-alaltaan $2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$ kokoisella eksitaatioalueella, ja alle $0,3^\circ$ MEA:n elektrodihilan kokoisella $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ alueella. Maksimaalinen pinta-ala, johon eksitaatiovalo voitiin näytettävä tai happianturia ja mikroskooppia liikuttamatta kohdistaa oli siis muutamien neliömillimetrin luokkaa. Tämä rajoittaa työssä käytetyn happianturin prototyypin käyttöä suuren mittakaavan soluanalyseissä. Kasvattamalla fotoilmaisimen pinta-alaa ja modifioimalla emissiovalon keräysoptiikkaa voidaan luotettavan eksitaatioalueen kokoa kasvattaa, arviolta jopa $3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$ kokoluokkaan asti käytettäessä tämän työn kokoluokan paraboloidista linssiä [30].

Laitteiston käyttöikä ei ole kiinni DMD:stä, joka kestää yli 100 000 tuntia käyttöä normaaleissa käyttölämpötiloissa ($+25$ – 45°C) ilman toimintakunnon heikentymistä [13]. Toimivan projektorin suhteellisen kosteuden raja on 95 % ja lämpötilarajat ovat -20°C ja $+90^\circ\text{C}$ [32].

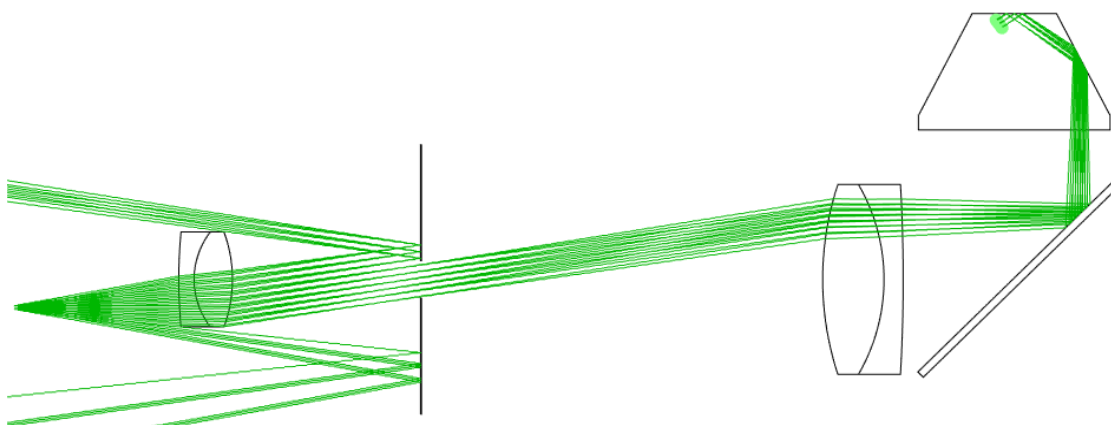
DMD:n mikrobeilissä voi tapahtua nivelen väsymistä, jos peili on pelkästään on- tai off-asennossa. Jos valo jää aina kohdistumatta samaan kohtaan, tälle alueelle valoa kohdistavat DMD:n peilit kääntyvät käytössä jatkuvasti vain off-asentoon. Koska taajuusmodulointi toteutettiin sytyttämällä ja katkaisemalla eksitaatiovalo valonlähteellä, käytön aikana peilit pysyvät samassa asennossa koko binäärikuvan ajan. Toisaalta vaikka valo kohdistettaisiin joka kerta samaan kohtaan, paikkakalibrointien aikana myös tälle alueelle valoa suuntaavat peilit kääntyvät off-asentoon. Mutta riittävätkö paikkakalibroinnit pienentämään näiden peilien on-off-kääntymissuhdetta tarpeeksi? Jatkuvasti saman asentoisten peilien riski hajota nivelen väsymisen johdosta on kuitenkin hyvin pieni, jollei käyttölämpötila nouse suureksi.

DMD mahdollistaa kohteen optisen manipuloinnin mikrometriluokan ja alle millisekuntiluokan tarkkuudella, joten tässä työssä kaikkia DMD:n tarjoamia mahdollisuuksia ei

käytetty hyväksi. Avaruudellista erotuskykyä rajoittaa linssioptiikka. Ajallista erotuskykyä rajoittaa mikrobeilien kytkentänopeus.

Solut eivät liiku merkittävästi paikkakalibroinnin ja mittauksen välillä, eivätkä mittauksen aikana. Periaatteessa laitteistoa voitaisiin käyttää myös yksittäisen, xy-tasossa liikkuvan solun hapenkulutuksen seurantaan. Ohjelmistoa olisi silloin kehitettävä tunnistamaan ja rajaamaan automaattisesti solu kuvasta, sekä nopean solun tapauksessa ennakoimaan sen tuleva sijainti. Kirjallisuudessa DMD:tä on käytetty liikkuvan kohteen stimulointiin: Leifer *et al.* [42] kuvasivat ja stimuloivat reaaliaikaisesti noin millimetrin kokoista sukkulamatoa. Heidän laitteistonsa ja kehittämänsä ohjelmisto suoriutuivat 20 millisekunnin aikana kuvan ottamisesta, lähettämisestä tietokoneelle, analysoinnista, stimuloitikoordinaateiksi muuttamisesta ja lähettämisestä DMD:lle. 10-kertaisella suurennuksella stimuloinnin tarkkuus oli noin 30 μm , kun heidän rakentamansa systeemin huipputarkkuus oli noin 5 μm .

Tässä työssä eksitaatiovalo saapui fluorofori-polymerikalvolle kohtisuoraan paraboloidisen linssin läpi. Tulevaisuudessa eksitaatiovalon suora pääsy solualueelle halutaan estää. Oleellista olisi, että näytteeseen saapuva eksitaatiovalo kokonaisheijastuisi näytterajapinnasta takaisin. Kuvassa 42 on esitetty eksitaatiovalonsäteiden suunniteltu kulku DMD:stä linssien ja himmentimen aukon läpi dikromaattiseen peiliin ja sieltä edelleen leikatun paraboloidisen linssin reunan kautta fluorofori-polymerikerrokseen. Eksitaatiovalo saapuisi polymerikerrokseen yli kriittisen kokonaisheijastuksen tulokulmassa polymerikerroksen normaaliin nähden. Simulaatio on tehty COMSOL-ohjelmistolla. Vain pieni osa DMD:n aktiivisesta alueesta heijastaisi eksitaatiovalon optiikan kautta eksitaatioalueelle. Hapenmittauksen lisäksi erillinen mikroskooppivalo voitaisiin tuoda keskemältä linssejä näytteeseen. Tällöin suurin osa DMD:n aktiivisesta alueesta heijastaisi valoa optiikan kautta keskelle dikromaattista peiliä, ja edelleen kohtisuoraan näytteeseen ja näytteen yläpuolella sijaitsevaan mikroskooppiin.



Kuva 42. COMSOL-simulaatio suunnitellusta eksitaatiosta.

Tässä työssä kehitettiin onnistunut paikkakalibrointimenetelmä (katso kuva 28). Kehitettyä kalibrointia on tulevaisuudessa testattava ja säädettävä käyttöön otettaessa suunniteltu

eksitaatiomenetelmä. Eksitaatiovalo ja mikroskooppivalo vaativat luultavasti erilliset paikkakalibroinnit.

LÄHTEET

- [1] Human Spare Parts stem cell research program, BioMediTech, Finland, web page. Available (accessed 26.04.2018): <http://humanspareparts.fi/>.
- [2] H. Välimäki, J. Verho, J. Kreutzer, D. Kattipparambil Rajan, T. Ryyänen, M. Pekkanen-Mattila, A. Ahola, K. Tappura, P. Kallio, J. Lekkala, Fluorimetric oxygen sensor with an efficient optical read-out for in vitro cell models, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 249, 2017, pp. 738-746.
- [3] S. Huang, C. Yu, Y. Chien, Light-Addressable Measurement of in Vivo Tissue Oxygenation in an Unanesthetized Zebrafish Embryo via Phase-Based Phosphorescence Lifetime Detection, *Sensors*, Vol. 15, Iss. 4, 2015, pp. 8146-8162.
- [4] A. Ponticorvo, A.K. Dunn, Simultaneous imaging of oxygen tension and blood flow in animals using a digital micromirror device, *Optics Express*, Vol. 18, Iss. 8, 2010, pp. 8160-8170.
- [5] H.T. Chu, Y.S. Lin, K.Y. Hung, S.H. Huang, Light-addressable measurements of cellular oxygen consumption rates in microwell arrays based on phase-based phosphorescence lifetime detection, 2013 Transducers Eurosensors XXVII: The 17th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems, 16-20 June 2013, IEEE, pp. 2090-2093.
- [6] K. Hane, M. Sasaki, Micro-Mirrors, in: Y.B. Gianchandani, O. Tabata, H. Zappe (ed.), *Comprehensive Microsystems*, Elsevier, Oxford, 2008, pp. 1-63.
- [7] L.J. Hornbeck, Digital Light Processing and MEMS: Timely Convergence for a Bright Future, *Proceedings of SPIE*, volume 2639, Micromachining and Microfabrication Process Technology, SPIE, pp. 25.
- [8] F4100/F4200 0.7XGA chipset, Femtech, web page. Available (accessed 01.08.2017): <http://www.fldiscovery.com/en/f4100f4200-0-7xga-tp/>.
- [9] FlexLight LC3000 Family, Keynote Photonics, web page. Available (accessed 07.08.2017): <http://www.keynotephotonics.com/lc3000-family/>.
- [10] B. Lee, System Design Considerations Using TI DLP® Technology down to 400 nm, Application notes Texas Instruments, 2015, 11 p. Available: <http://www.ti.com/lit/an/dlpa052/dlpa052.pdf>.
- [11] Digital Light Processing transforms travel information, ITS International, web page. Available (accessed 01.08.2017): <http://www.itsinternational.com/sections/transmart/features/digital-light-processing-transforms-travel-information/>.

- [12] L. Hornbeck, Digital Light Processing for High-Brightness, High-Resolution Applications, Proceedings of SPIE, volume 3013, Projection Displays III, San Jose, California, USA, 10-12 Feb, 1997, SPIE, Bellingham, Washington, USA, pp. 14.
- [13] M. Douglass, DMD reliability: a MEMS success story, Proceedings of SPIE, volume 4980, Reliability, Testing, and Characterization of MEMS/MOEMS II, SPIE, pp. 11.
- [14] B. Lee, DMD 101: Introduction to Digital Micromirror Device (DMD) Technology, Application notes Texas Instruments, 2013, 11 p. Available: <http://www.ti.com/lit/an/dlpa008a/dlpa008a.pdf>.
- [15] Why is the Texas Instruments Digital Micromirror Device so reliable? White papers Digital Light Innovations, 7 p. Available: <https://www.dlinnovations.com/dli/wp-content/uploads/white-paper-why-is-texas-instruments-dmd-so-reliable.pdf>.
- [16] Wavelength Transmittance Considerations for DLP® DMD Window, Application notes Texas Instruments, 2014, 6 p. Available: <http://www.ti.com/lit/an/dlpa031c/dlpa031c.pdf>.
- [17] Laser power handling for DMDs, White papers Texas Instruments, 2012, 11 p. Available: <http://www.ti.com/lit/wp/dlpa027/dlpa027.pdf>.
- [18] DLP Products - Advanced light control applications, Texas Instruments, web page. Available (accessed 30.04.2018): <http://www.ti.com/dlp-chip/advanced-light-control/applications.html>.
- [19] Y. Ren, R. Lu, L. Gong, Tailoring light with a digital micromirror device, Annalen der Physik, Vol. 527, Iss. 7-8, 2015, pp. 447-470.
- [20] J.L. Curley, S.R. Jennings, M.J. Moore, Fabrication of micropatterned hydrogels for neural culture systems using dynamic mask projection photolithography. Journal of visualized experiments : JoVE, Iss. 48, 2011, .
- [21] D. Kattiparambil Rajan, J. Raunio, M.T. Karjalainen, T. Ryyänen, J. Lekkala, Novel method for intensity correction using a simple maskless lithography device, Sensors and Actuators A: Physical, Vol. 194, 2013, pp. 40-46.
- [22] Pattern and Point Illumination for Microscopy, Rapp OptoElectronic, web page. Available (accessed 24.08.2017): http://www.rapp-opto.com/pattern_and_spot_illumination.html.
- [23] D. Ghezzi, Coupling MEA Recordings and Optical Stimulation: New Optoelectronic Biosensors, in: P. Predeep (ed.), Optoelectronics - Devices and Applications, InTech, Rijeka, Croatia, 2011, .
- [24] S. Chao, M.R. Holl, S.C. McQuaide, T.T.H. Ren, S.A. Gales, D.R. Meldrum, Phosphorescence lifetime based oxygen micro-sensing using a digital micromirror device, Optics Express, Vol. 15, Iss. 17, 2007, pp. 10681-10689.

- [25] S. Huang, C. Tsai, C. Wu, C. Wu, Light-directed, spatially addressable oxygen detection in a hydrogel microarray based on phase-based lifetime detection using a digital micromirror device, *Sensors and Actuators A: Physical*, Vol. 165, Iss. 2, 2011, pp. 139-146.
- [26] PtTFPP, PubChem, web page. Available (accessed 09.08.2017): <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5190808#section=Top>.
- [27] A. Mills, Optical Oxygen Sensors: Utilising the Luminescence of Platinum Metals Complexes, *Platinum Metals Review*, Vol. 41, Iss. 3, 1997, pp. 115-127.
- [28] PtTFPP, Fluorophores.org, web page. Available (accessed 18.07.2017): <http://www.fluorophores.tugraz.at/substance/61>.
- [29] C.D. Gebbes, *Reviews in Fluorescence 2016*, Springer International Publishing, 2017, 360 p.
- [30] H. Välimäki, *Diplomi-insinööri, tutkimusryhmän jäsen, Tampereen teknillinen yliopisto, Haastattelu 2017-2018*.
- [31] DLP3000 DLP 0.3 WVGA Series 220 DMD, Texas Instruments, 2015, 38 p. Available: <http://www.ti.com/lit/ds/symlink/dlp3000.pdf>.
- [32] DLP4500 0.45 WXGA DMD datasheet (Rev. B), Texas Instruments, 2016, .
- [33] M. Welkenhuysen, L. Hoffman, Z. Luo, A.D. Proft, C.V.d. Haute, V. Baekelandt, Z. Debyser, G. Gielen, R. Puers, D. Braeken, An integrated multi-electrode-optrode array for in vitro optogenetics, *Scientific Reports*, Vol. 6, Iss. 20353, 2016, pp. 1-10. Available (accessed 03.02.2017): <http://www.nature.com/srep/2016/160202/srep20353/full/srep20353.html>.
- [34] DLP® LightCrafter™ Evaluation Module (EVM) User's Guide, Texas Instruments, 2014, 64 p. Available: <http://www.ti.com/lit/ug/dlpu006e/dlpu006e.pdf>.
- [35] TI DLP® LightCrafter™ 4500 Evaluation Module User's Guide (Rev. F), Texas Instruments, 2017, 66 p. Available: <http://www.ti.com/lit/ug/dlpu011f/dlpu011f.pdf>.
- [36] DLP® 0.45 WXGA Chipset (Rev. A) Data Manual, Texas Instruments, 2013, 24 p. Available: <http://www.ti.com/lit/er/dlpu009a/dlpu009a.pdf>.
- [37] P. Gelabert A look inside the iView Engine in LightCrafter4500, Texas Instruments E2E™ Community, web page. Available (accessed 25.08.2017): https://e2e.ti.com/support/dlp_mems_micro-electro-mechanical_systems/advanced_light_control/f/924/p/278008/1345454?tisearch=e2e-sitesearch&keymatch=4500%20inside#1345454.
- [38] N. Pascal, *Geometric Optics for DLP®*, Application notes Texas Instruments, 2013, 16 p. Available: <http://www.ti.com/lit/an/dlpa044/dlpa044.pdf>.

[39] LE B Q9WP, Mouser Electronics, 2012, 21 p. Available:
http://www.mouser.com/ds/2/311/osram%20opto%20semiconductor_le%20b%20q9wp%20-%20osram%20ostar%20p-489429.pdf.

[40] LE CG Q9WP, Mouser Electronics, 2012, 22 p. Available:
http://www.mouser.com/ds/2/311/osram%20opto%20semiconductor_le%20cg%20q9wp%20-%20osram%20ostar%20p-489432.pdf.

[41] LE A Q9WP, Mouser Electronics, 2013, 21 p. Available:
http://www.mouser.com/ds/2/311/osram%20opto%20semiconductor_le%20b%20q9wp%20-%20osram%20ostar%20p-489429.pdf.

[42] A.M. Leifer, C. Fang-Yen, M. Gershow, M.J. Alkema, A.D.T. Samuel, Optogenetic manipulation of neural activity in freely moving *Caenorhabditis elegans*, *Nature Methods*, Vol. 8, Iss. 2, 2011, pp. 147-152.